(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12)**公表特許公報（Ａ）**　(11)特許出願公表番号

特表2015-520257

（Ｐ２０１５－５２０２５７Ａ）

(43)公表日　平成27年7月16日(2015.7.16)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード(参考)
Ｃ１１Ｃ　3/00	*(2006.01)*	Ｃ１１Ｃ	3/00	ＺＮＡ	２Ｂ０３０
Ｃ１２Ｎ　15/09	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ	４Ｂ０２４
Ａ０１Ｈ　5/00	*(2006.01)*	Ａ０１Ｈ	5/00	Ａ	４Ｂ０５０
Ａ０１Ｈ　1/00	*(2006.01)*	Ａ０１Ｈ	1/00	Ａ	４Ｂ０６３
Ｃ１２Ｎ　9/16	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/16		４Ｂ０６５

審査請求　未請求　　予備審査請求　未請求　（全151頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-507304(P2015-507304)
(86)(22)出願日　平成25年4月24日(2013.4.24)
(85)翻訳文提出日　平成27年1月5日(2015.1.5)
(86)国際出願番号　PCT/AU2013/000426
(87)国際公開番号　WO2013/159149
(87)国際公開日　平成25年10月31日(2013.10.31)
(31)優先権主張番号　61/638,447
(32)優先日　平成24年4月25日(2012.4.25)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　2012903992
(32)優先日　平成24年9月11日(2012.9.11)
(33)優先権主張国　オーストラリア(AU)

(71)出願人　590003283
コモンウェルス　サイエンティフィック　アンド　インダストリアル　リサーチ　オーガナイゼーション
オーストラリア国　３１６９　クレイトン　サウス　ロックト　バッグ　１０
(71)出願人　506415252
グレインズ・リサーチ・アンド・ディヴェロップメント・コーポレーション
オーストラリア・オーストラリアン・キャピタル・テリトリー・２６００・バートン・ナショナル・サーキット・４・レヴェル・４
(74)代理人　100108453
弁理士　村山　靖彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】高オレイン酸油

(57)【要約】
本発明は、高レベル、例えば、９０重量％～９５重量％のオレイン酸を含む抽出された脂質に関する。本発明はまた、概して、遺伝的に修飾された植物、具体的には、この脂質を生成するために使用することができるベニバナ等の油糧種子を提供する。さらに、この脂質を生成するために使用することができる植物の遺伝子型を決定し、選択するための方法が提供される。

1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
油糧種子から抽出される脂質であって、前記脂質がグリセロールにエステル化された脂肪酸から成るトリアシルグリセロール（ＴＡＧ）を含み、
ｉ）前記脂肪酸がパルミチン酸およびオレイン酸を含み、
ｉｉ）前記脂質の少なくとも９５重量%がＴＡＧであり、
ｉｉｉ）前記脂質の全脂肪酸含量の約９０重量%～約９５重量%がオレイン酸であり、
ｉｖ）前記脂質の全脂肪酸含量の約３．１重量%未満がパルミチン酸であり、
ｖ）前記脂質が約０．０３７未満のオレイン酸不飽和率（ＯＤＰ）および／または約０．０６３未満のパルミチン酸－リノール酸－オレイン酸の値（ＰＬＯ）を有する、脂質。
【請求項２】
以下の特徴のうちの１つ以上またはすべてを有する、請求項１に記載の脂質：
ａ）前記脂質の全脂肪酸含量の約９０重量%～約９４重量%、または約９１重量%～約９４重量%、または約９１重量%～約９２重量%、または約９２重量%、または約９３重量%がオレイン酸である、
ｂ）前記脂質の全脂肪酸含量の約３重量%未満、または約２．７５重量%未満、または約２．５重量%未満、または約３重量%、または約２．７５重量%、または約２．５重量%、または約２．３重量%がパルミチン酸である、
ｃ）前記脂質の全脂肪酸含量の約０．１重量%～約３重量%、または約２重量%～約３重量%、または約３重量%、または約２重量%が多価不飽和脂肪酸（ＰＵＦＡ）である、
ｄ）前記脂質の全脂肪酸含量の約３重量%未満、または約２．５重量%未満、または約２．２５重量%未満、または約３重量%、または約２．５重量%、または約２．２５重量%がリノール酸である、
ｅ）前記脂質の全脂肪酸含量の約１重量%未満、または約０．５重量%未満がα－リノレン酸（ＡＬＡ）である、
ｆ）前記脂質の全脂肪酸含量の約０．５重量%～約１重量%が１８：１Δ１１である、
ｇ）前記脂質の脂肪酸含量のＯＤＰが、約０．０３３～約０．０１、または約０．０３３～約０．０１６、または約０．０３３～約０．０２３であるか、または約０．０３、または約０．０２、または約０．０１である、
ｈ）前記脂質の脂肪酸含量のＰＬＯ値が、約０．０２０～約０．０６３、または約０．０２０～約０．０５５、または約０．０２０～約０．０５０、または約０．０５０～約０．０５５、または約０．０６３、または約０．

2

０５５、または約０．０５０、または約０．０４０、または約０．０３０、または約０．０２０である、
ｉ）前記脂質の全脂肪酸含量の約９０重量%～約９６重量%、または約９２重量%～約９６重量%、または約９３重量%、または約９４重量%が、一価不飽和脂肪酸である、
ｊ）前記脂質が、約０．０２未満、または約０．０１５未満、または約０．００５～約０．０２のオレイン酸一価不飽和率（ＯＭＰ）を有する、
ｋ）前記脂質が、精製油の形態である、および
ｌ）前記脂質が水素化されていない。
【請求項３】
前記ＰＵＦＡがリノール酸である、請求項２に記載の脂質。
【請求項４】
α－リノレン酸が前記脂質の前記脂肪酸含量中で検出不能である、請求項１～３のいずれか一項に記載の脂質。
【請求項５】
前記脂質のＴＡＧ含量の約５５%～約８０%、または約６０%～約８０%、または約７０%～約８０%、または少なくとも約６０%、または少なくとも約７０%、または約６０%、または約７０%、または約８０%が、トリオレインである、請求項１～４のいずれか一項に記載の脂質。
【請求項６】
前記脂質の前記オレイン酸含量の約５%未満、または約２%未満、または約０．１%～約５%が、ジアシルグリセロール（ＤＡＧ）の形態である、請求項１～５のいずれか一項に記載の脂質。
【請求項７】
油の形態であり、前記油の少なくとも９０重量%、または最も少なくて９５重量%、少なくとも約９８重量%、または約９５重量%～約９８重量%が、前記脂質である、請求項１～６のいずれか一項に記載の脂質。
【請求項８】
前記油糧種子が、非光合成の油糧種子、好ましくは、ベニバナ、ヒマワリ、綿、またはトウゴマからの種子である、請求項７に記載の脂質。
【請求項９】
１つ以上のステロールをさらに含む、請求項１～８のいずれか一項に記載の脂質。
【請求項１０】
油の形態であり、約５ｍｇ未満のステロール／ｇ（油）、または約１．５ｍｇのステロール／ｇ（油）～約５ｍｇのステロール／ｇ（油）を含む、請求項９に記載の脂質。
【請求項１１】
ａ）前記全ステロール含量の約１．５%～約４．５%、または約２．３%～約４．５%がエルゴスト－７－エン－３β－オールである、

3

ｂ）前記全ステロール含量の約０．５％～約３％、または約１．５％～約３％がトリテルペノイドアルコールである、
ｃ）前記全ステロール含量の約８．９％～約２０％がΔ７－スチグマステロール／スチグマスト－７－エン－３β－オールである、および
ｄ）前記全ステロール含量の約１．７％～約６．１％がΔ７－アベナステロールである、のうちの１つ以上またはすべてを含む、請求項１０に記載の脂質。
【請求項１２】
少なくとも１リットルの体積および／もしくは少なくとも１ｋｇの重量を有する、ならびに／または野外生育植物から得られた油糧種子から抽出された、請求項１～１１のいずれか一項に記載の脂質。
【請求項１３】
請求項１～１２のいずれか一項に記載の脂質である第１の成分と、第２の成分とを含む組成物であって、好ましくは、前記組成物が前記脂質を前記第２の成分と混合することによって生成された、組成物。
【請求項１４】
前記第２の成分が非脂質物質、例えば、酵素、非タンパク質触媒もしくは化学物質、または食餌の１つ以上の成分である、請求項１３に記載の組成物。
【請求項１５】
油を生成するためのプロセスであって、
ｉ）油を含む、および／または油を含む油糧種子を生成する植物を生成することができる油糧種子を得ることであって、前記油糧種子の前記油含有物が、請求項１～１２のいずれか一項に定義されるような脂質である、油糧種子を得ることと、
ｉｉ）前記油糧種子から油を抽出し、それによって前記油を生成することと、を含む、プロセス。
【請求項１６】
前記油糧種子が、第１の外因性ポリヌクレオチドを欠失している対応する油糧種子と比較して、発育中の油糧種子においてΔ１２デサチュラーゼ（ＦＡＤ２）遺伝子の発現を減少させることができる第１のサイレンシングＲＮＡをコードする第１の外因性ポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドが、前記発育中の油糧種子において前記ポリヌクレオチドの発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結される、請求項１５に記載のプロセス。
【請求項１７】
油を生成するためのプロセスであって、
ｉ）ベニバナ種子を得ることであって、その油含有物がグリセロールにエステル化された結合脂肪酸から成るトリアシルグリセロール（ＴＡＧ）を含む、および／または油含有物がそれを含む種子を生成する植物を生成することができ、
ａ）前記脂肪酸がパルミチン酸およびオレイン酸を含み、
ｂ）前記種子の前記油含有物の少なくとも９５重量%がＴＡＧであり、
ｃ）前記種子の前記油含有物の全脂肪酸の約７５重量%～約９５重量%がオレイン酸であり、
ｄ）前記種子の前記油含有物の全脂肪酸の約５．１重量%未満がパルミチン酸であり、
ｅ）前記種子の前記油含有物が、約０．１７未満のオレイン酸不飽和率（ＯＤＰ）、および／または約０．２６未満のパルミチン酸－リノール酸－オレイン酸（ＰＬＯ）値を有する、ベニバナ種子を得ることと、
ｉｉ）前記ベニバナ種子から油を抽出し、それによって前記油を生成することと、を含み、
前記ベニバナ種子が、第１の外因性ポリヌクレオチドを欠失している対応するベニバナ種子と比較して、発育中のベニバナ種子においてΔ１２デサチュラーゼ（ＦＡＤ２）遺伝子の発現を減少させることができる第１のサイレンシングＲＮＡをコードする第１の外因性ポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドが、前記発育中のベニバナ種子において前記ポリヌクレオチドの発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結される、プロセス。
【請求項１８】
前記油糧種子またはベニバナ種子が、第２の外因性ポリヌクレオチドを欠失している対応する油糧種子またはベニバナ種子と比較して、発育中の油糧種子またはベニバナ種子においてパルミトイル－ＡＣＰチオエステラーゼ（ＦＡＴＢ）遺伝子の発現を減少させることができる第２のサイレンシングＲＮＡをコードする第２の外因性ポリヌクレオチドを含み、前記第２の外因性ポリヌクレオチドが、前記発育中の油糧種子またはベニバナ種子において前記ポリヌクレオチドの発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結される、請求項１６または請求項１７に記載のプロセス。
【請求項１９】
前記油糧種子またはベニバナ種子が、第３の外因性ポリヌクレオチドを欠失している対応する油糧種子またはベニバナ種子と比較して、発育中の油糧種子またはベニバナ種子において色素体ω６脂肪酸デサチュラーゼ（ＦＡＤ６）遺伝子の発現を減少させることができる第３のサイレンシングＲＮＡをコードする第３の外因性ポリヌクレオチドを含み、前記第３の外因性ポリヌクレオチドが、前記発育中の油糧種子またはベニバナ種子において前記ポリヌクレオチドの発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結される、請求項１６～１８のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項２０】
１）前記ＦＡＤ２遺伝子が、ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子、ＣｔＦＡＤ２－２遺伝子、およびＣｔＦＡＤ２－１０遺伝子のうちの１つ以上である、ならびに／または

5

２）前記ＦＡＴＢ遺伝子が、ＣｔＦＡＴＢ－３遺伝子である、ならびに／または
３）前記ＦＡＤ６遺伝子が、ＣｔＦＡＤ６遺伝子である、請求項１７～１９のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項２１】
前記ベニバナ種子の油含有物が、、以下の特徴のうちの１つ以上またはすべてを有する、請求項１７～２０のいずれか一項に記載のプロセス：
ａ）前記種子の油含有物の全脂肪酸の約８０重量%～約９４重量%、または約８５重量%～約９４重量%、または約９０重量%～約９４重量%、または約９１重量%～約９４重量%、または約９１重量%～約９２重量%、または約９２重量%、または約９３重量%が、オレイン酸である、
ｂ）前記種子の油含有物の全脂肪酸の約５重量%未満、または約４重量%未満、または約３重量%未満、または約２．７５重量%未満、または約２．５重量%未満、または約３重量%、または約２．７５重量%、または約２．５重量%が、パルミチン酸である、
ｃ）前記種子の油含有物の全脂肪酸の約０．１重量%～約１５重量%、または約０．１重量%～約１０重量%、または約０．１重量%～約７．５重量%、または約０．１重量%～約５重量%、または約０．１重量%～約３重量%、または約２重量%～約３重量%、または約３重量%、または約２重量%が、多価不飽和脂肪酸（ＰＵＦＡ）である、
ｄ）前記種子の油含有物の全脂肪酸の約１５重量%未満、または約１０重量%未満、または約５重量%未満、または約３重量%未満、または約２．５重量%未満、または約２．２５重量%未満、または約３重量%、または約２．５重量%、または約２．２５重量%が、リノール酸（ＬＡ）である、
ｅ）前記脂質の全脂肪酸含量の約８０重量%～約９６重量%、または約９０重量%～約９６重量%、または約９２重量%～約９６重量%、または約９３重量%、または約９４重量%が、一価不飽和脂肪酸である、
ｆ）前記脂質が、約０．０５未満、または約０．０２未満、または約０．０１５未満、または約０．００５～約０．０５、または約０．００５～約０．０２のオレイン酸一価不飽和率（ＯＭＰ）を有する、
ｇ）前記種子の油含有物のＯＤＰが、約０．１７～約０．０１、または約０．１５～約０．０１、または約０．１～約０．０１、または約０．０７５～約０．０１、または約０．０５０～約０．０１、または約０．０３３～約０．０１、または約０．０３３～約０．０１６、または約０．０３３～約０．０２３であるか、または約０．０３、または約０．０２、または約０．０１である、ならびに
ｈ）前記種子の油含有物のＰＬＯ値が、約０．０２０～約０．２６、または約０．０２０～約０．２０、または約０．０２０～約０．１５、または約０．０２０～約０．１、または約０．０２０および約０．０７５、または約０．０５０および約０．０５５であるか、または約０．０５、または約０．０４０、または約０．０３０、または約０．０２０である。
【請求項２２】
前記油が、請求項３～７または９～１１に記載の特徴のうちの１つ以上をさらに特徴とする脂質である、請求項１７～２１のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項２３】
前記油を抽出するステップが、前記油糧種子または前記ベニバナ種子を粉砕することを含む、請求項１６～２２のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項２４】
前記油糧種子または前記ベニバナ種子から抽出された油を精製するステップをさらに含み、前記精製ステップは、前記抽出された油を脱ガム、脱臭、脱色、乾燥、および／または分留すること、ならびに／あるいは前記抽出された油からの少なくとも一部の、好ましくは実質的にはすべてのワックスおよび／もしくはワックスエステルを除去すること、から成る群のうちの１つ以上またはすべてを含む、請求項１６～２３のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項２５】
油含有物がグリセロールにエステル化された脂肪酸から成るトリアシルグリセロール（ＴＡＧ）を含む、および／または油含有物がグリセロールにエステル化された脂肪酸から成るトリアシルグリセロール（ＴＡＧ）を含む油糧種子を生成する植物を生成することができる、油糧種子であって、
ｉ）前記脂肪酸がパルミチン酸およびオレイン酸を含み、
ｉｉ）前記油糧種子の油含有物の少なくとも９５重量%がＴＡＧであり、
ｉｉｉ）前記油糧種子の油含有物の全脂肪酸の約９０重量%～約９５重量%がオレイン酸であり、
ｉｖ）前記油糧種子の油含有物の全脂肪酸の約３．１重量%未満がパルミチン酸であり、
ｖ）前記油糧種子の前記油含有物が約０．０３７未満のオレイン酸不飽和率（ＯＤＰ）および／または約０．０６３未満のパルミチン酸－リノール酸－オレイン酸（ＰＬＯ）値を有する、油糧種子。
【請求項２６】
非光合成の油糧種子、好ましくは、ベニバナ、ヒマワリ、綿、またはトウゴマである、請求項２５に記載の油糧種子。
【請求項２７】
第１の外因性ポリヌクレオチドを欠失している対応する油糧種子と比較して、発育中の油糧種子においてΔ１２デサチュラーゼ（ＦＡＤ２）遺伝子の発現を可能にする

6

、または減少させる第１のサイレンシングＲＮＡをコードする第１の外因性ポリヌクレオチドを含み、前記第１の外因性ポリヌクレオチドが、前記発育中の油糧種子において前記ポリヌクレオチドの発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結される、請求項２５または請求項２６に記載の油糧種子。

【請求項２８】

油含有物がグリセロールにエステル化された脂肪酸から成るトリアシルグリセロール（ＴＡＧ）を含む、および／または油含有物がグリセロールにエステル化された脂肪酸から成るトリアシルグリセロール（ＴＡＧ）を含む種子を生成する植物を生成することができるベニバナ種子であって、

ｉ）前記脂肪酸がパルミチン酸およびオレイン酸を含み、

ｉｉ）前記種子の油含有物の少なくとも９５重量%がＴＡＧであり、

ｉｉｉ）前記種子の油含有物の全脂肪酸の約７５重量%～約９５重量%がオレイン酸であり、

ｉｖ）前記種子の油含有物の全脂肪酸の約５．１重量%未満がパルミチン酸であり、

ｖ）前記種子の油含有物が、約０．１７未満のオレイン酸不飽和率（ＯＤＰ）および／または約０．２６未満のパルミチン酸－リノール酸－オレイン酸（ＰＬＯ）値を有し、

前記ベニバナ種子が、第１の外因性ポリヌクレオチドを欠失している対応するベニバナ種子と比較して、発育中のベニバナ種子においてΔ１２デサチュラーゼ（ＦＡＤ２）遺伝子の発現を減少させることができる第１のサイレンシングＲＮＡをコードする第１の外因性ポリヌクレオチドを含み、前記第１の外因性ポリヌクレオチドが、前記発育中のベニバナ種子において前記ポリヌクレオチドの発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結される、ベニバナ種子。

【請求項２９】

前記種子の油含有物が、、以下の特徴のうちの１つ以上を有する、請求項２８に記載のベニバナ種子：

ａ）前記種子の油含有物の全脂肪酸の約８０重量%～約９４重量%、または約８５重量%～約９４重量%、または約９０重量%～約９４重量%、または約９１重量%～約９４重量%、または約９１重量%～約９２重量%、または約９２重量%、または約９３重量%が、オレイン酸である、

ｂ）前記種子の油含有物の全脂肪酸の約５重量%未満、または約４重量%未満、または約３重量%未満、または約２．７５重量%未満、または約２．５重量%未満、または約３重量%、または約２．７５重量%、または約２．５重量%が、パルミチン酸である、

ｃ）前記種子の油含有物の全脂肪酸の約０．１重量%～約１５重量%、または約０．１重量%～約１０重量%、

または約０．１重量%～約７．５重量%、または約０．１重量%～約５重量%、または約０．１重量%～約３重量%、または約２重量%～約３重量%、または約３重量%、または約２重量%が、多価不飽和脂肪酸（ＰＵＦＡ）である、

ｄ）前記種子の油含有物の全脂肪酸の約１５重量%未満、または約１０重量%未満、または約５重量%未満、または約３重量%未満、または約２．５重量%未満、または約２．２５重量%未満、または約３重量%、または約２．５重量%、または約２．２５重量%が、リノール酸（ＬＡ）である、

ｅ）前記脂質の全脂肪酸含量の約８０重量%～約９６重量%、または約９０重量%～約９６重量%、または約９２重量%～約９６重量%、または約９３重量%、または約９４重量%が、一価不飽和脂肪酸である、

ｆ）前記脂質が、約０．０５未満、または約０．０２未満、または約０．０１５未満、または約０．００５～約０．０５、または約０．００５～約０．０２のオレイン酸一価不飽和率（ＯＭＰ）を有する、

ｇ）前記種子の油含有物のＯＤＰが、約０．１７～約０．０１、または約０．１５～約０．０１、または約０．１～約０．０１、または約０．０７５～約０．０１、または約０．０５０～約０．０１、または約０．０３３～約０．０１、または約０．０３３～約０．０１６、または約０．０３３～約０．０２３であるか、または約０．０３、または約０．０２、または約０．０１である、ならびに

ｈ）前記種子の油含有物のＰＬＯ値が、約０．０２０～約０．２６、または約０．０２０～約０．２、または約０．０２０～約０．１５、または約０．０２０～約０．１、または約０．０２０および約０．０７５、または約０．０５０および約０．０５５であるか、または約０．０５、または約０．０４０、または約０．０３０、または約０．０２０である。

【請求項３０】

前記種子の油含有物が、請求項３～７または９～１１に記載の特性のうちの１つ以上をさらに特徴とする脂質である、請求項２５～２９のいずれか一項に記載の油糧種子またはベニバナ種子。

【請求項３１】

第２の外因性ポリヌクレオチドを欠失している対応する油糧種子またはベニバナ種子と比較して、発育中の油糧種子またはベニバナ種子においてパルミトイル－ＡＣＰチオエステラーゼ（ＦＡＴＢ）遺伝子の発現を減少させることができる第２のサイレンシングＲＮＡをコードする第２の外因性ポリヌクレオチドを含み、前記第２の外因性ポリヌクレオチドが、前記発育中の油糧種子またはベニバナ種子において前記ポリヌクレオチドの発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結される、請求項２７～３０のいずれか一項に記載の油糧種子またはベニバ

9

ナ種子。

【請求項３２】

第３の外因性ポリヌクレオチドを欠失している対応する油糧種子またはベニバナ種子と比較して、発育中の油糧種子またはベニバナ種子において色素体ω６脂肪酸デサチュラーゼ（ＦＡＤ６）遺伝子の発現を減少させることができる第３の外因性ポリヌクレオチドを含み、前記第３の外因性ポリヌクレオチドが、前記発育中の油糧種子またはベニバナ種子において前記ポリヌクレオチドの発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結される、請求項２７～３１のいずれか一項に記載の油糧種子またはベニバナ種子。

【請求項３３】

前記第１のサイレンシングＲＮＡが、発育中の油糧種子またはベニバナ種子においてＦＡＤ２をコードする１つを超える外因性遺伝子の発現を減少させる、および／または前記第２のサイレンシングＲＮＡが、発育中の油糧種子またはベニバナ種子においてＦＡＴＢをコードする１つを超える外因性遺伝子の発現を減少させる、請求項２７～３２のいずれか一項に記載の油糧種子またはベニバナ種子。

【請求項３４】

前記第１の外因性ポリヌクレオチド、ならびに前記第２の外因性ポリヌクレオチドおよび前記第３の外因性ポリヌクレオチドのいずれかまたはその両方が、単一のＤＮＡ分子に、任意に、前記第１、前記第２、および／または前記第３の外因性ポリヌクレオチド間の連結するＤＮＡ配列と共有結合する、請求項２７～３３のいずれか一項に記載の油糧種子またはベニバナ種子。

【請求項３５】

前記第１の外因性ポリヌクレオチド、ならびに前記第２の外因性ポリヌクレオチドおよび前記第３の外因性ポリヌクレオチドのいずれかまたはその両方が、単一のプロモーターの制御下にあり、そのため、前記第１の外因性ポリヌクレオチドおよび前記第２の外因性ポリヌクレオチドおよび／または前記第３の外因性ポリヌクレオチドが前記発育中の油糧種子またはベニバナ種子において転写される場合、前記第１のサイレンシングＲＮＡおよび前記第２のサイレンシングＲＮＡおよび／または前記第３のサイレンシングＲＮＡが単一のＲＮＡ転写物の一部として共有結合する、請求項３４に記載の油糧種子またはベニバナ種子。

【請求項３６】

前記油糧種子またはベニバナ種子のゲノムに組み込まれた単一のトランスファーＤＮＡを含み、前記単一のトランスファーＤＮＡが、前記第１の外因性ポリヌクレオチド、ならびに前記第２の外因性ポリヌクレオチドおよび前記第３の外因性ポリヌクレオチドのいずれかまたはその両方を含む、請求項２７～３５のいずれか一項に記載の油糧種子またはベニバナ種子。

10

【請求項３７】

前記トランスファーＤＮＡにとってホモ接合である、請求項３６に記載の油糧種子またはベニバナ種子。

【請求項３８】

前記第１のサイレンシングＲＮＡ、前記第２のサイレンシングＲＮＡ、および前記第３のサイレンシングＲＮＡがそれぞれ独立して、アンチセンスポリヌクレオチド、センスポリヌクレオチド、触媒ポリヌクレオチド、マイクロＲＮＡ、および二本鎖ＲＮＡから成る群から選択される、請求項２７～３７のいずれか一項に記載の油糧種子またはベニバナ種子。

【請求項３９】

前記プロモーターのうちのいずれか１つ以上、好ましくはすべてが、種子特異的であり、好ましくは、発育中の油糧種子またはベニバナ種子の胚内において選択的に発現される、請求項２７～３８のいずれか一項に記載の油糧種子またはベニバナ種子。

【請求項４０】

１つ以上のＦＡＤ２遺伝子において、１つ以上の突然変異体を含み、前記突然変異体（複数を含む）が、前記突然変異体（複数を含む）を欠失している対応する油糧種子またはベニバナ種子と比較して、発育中の油糧種子またはベニバナ種子において前記１つ以上のＦＡＤ２遺伝子の活性を軽減させる、請求項２５～３９のいずれか一項に記載の油糧種子またはベニバナ種子。

【請求項４１】

対応する油糧種子またはベニバナ種子において野生型ＦＡＤ２遺伝子と比較して、ＦＡＤ２遺伝子の突然変異体を含み、その突然変異が、欠失、挿入、逆位、フレームシフト、早期翻訳終止コドン、または１つ以上の非保存アミノ酸置換である、請求項４０に記載の油糧種子またはベニバナ種子。

【請求項４２】

前記突然変異体が、前記ＦＡＤ２遺伝子のヌル突然変異体である、請求項４０または請求項４１に記載の油糧種子またはベニバナ種子。

【請求項４３】

前記突然変異体のうちの少なくとも１つが、前記発育中の油糧種子またはベニバナ種子において任意の他のＦＡＤ２遺伝子よりも突然変異体（複数を含む）を欠失している前記発育中の油糧種子またはベニバナ種子においてさらなるＦＡＤ２活性をコードするＦＡＤ２遺伝子内にある、請求項４０～４２のいずれか一項に記載の油糧種子またはベニバナ種子。

【請求項４４】

ベニバナ種子であり、ＦＡＤ２遺伝子が前記ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子である、請求項４０～４３のいずれか一項に記載の油糧種子またはベニバナ種子。

【請求項４５】

前記ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子のｏｌ対立遺伝子または前

11

記ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子のｏｌ１対立遺伝子を含むベニバナ種子である、請求項４０～４４のいずれか一項に記載の油糧種子またはベニバナ種子。

【請求項４６】

前記ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子の前記ｏｌ対立遺伝子または前記ｏｌ１対立遺伝子がホモ接合状態で存在する、請求項４５に記載の油糧種子またはベニバナ種子。

【請求項４７】

ＦＡＤ２タンパク質が、前記種子において検出不能である、請求項２５～４６のいずれか一項に記載の油糧種子またはベニバナ種子。

【請求項４８】

ベニバナ種子であり、前記第１のサイレンシングＲＮＡがＣｔＦＡＤ２－１およびＣｔＦＡＤ２－２遺伝子の両方の発現を減少させる、請求項２７～４７のいずれか一項に記載の油糧種子またはベニバナ種子。

【請求項４９】

ベニバナ種子であり、

１）前記ＦＡＤ２遺伝子が、ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子、ＣｔＦＡＤ２－２遺伝子、およびＣｔＦＡＤ２－１０遺伝子のうちの１つ以上である、ならびに／または

２）前記ＦＡＴＢ遺伝子が、ＣｔＦＡＴＢ－３遺伝子である、ならびに／または

３）前記ＦＡＤ６遺伝子が、ＣｔＦＡＤ６遺伝子である、請求項２７～４８のいずれか一項に記載の油糧種子またはベニバナ種子。

【請求項５０】

請求項２５～４９のいずれか一項に記載の種子を生成することが可能である、油糧種子植物またはベニバナ植物。

【請求項５１】

トランスジェニックであり、それぞれの外因性ポリヌクレオチドにとってホモ接合である、および／または前記第１の外因性ポリヌクレオチド、ならびに前記第２の外因性ポリヌクレオチドまたは前記第３の外因性ポリヌクレオチドのいずれかまたはその両方を含む、請求項５０に記載の植物。

【請求項５２】

配列番号２７～３７、４４、４５、もしくは４８のうちのいずれか１つに提供される配列、その生物学的に活性な断片、または配列番号２７～３７、４４、４５、もしくは４８のうちのいずれか１つ以上と少なくとも４０％同一であるアミノ酸配列を有するアミノ酸を含む、実質的に精製された、および／または組み換えポリペプチド。

【請求項５３】

脂肪酸を修飾する酵素、好ましくは、オレイン酸塩Δ１２デサチュラーゼ、Δ１２－アセチレナーゼ、パルミトレイン酸塩Δ１２デサチュラーゼ、またがパルミトイル－ＡＣＰチオエステラーゼ（ＦＡＴＢ）である、請求項５２に記載のポリペプチド。

12

【請求項５４】

単離されたおよび／または外因性ポリヌクレオチドであって、

ｉ）配列番号１～２５、４０～４３、４６、または４７のうちのいずれか１つに提供される配列を有するヌクレオチド、

ｉｉ）請求項５２または請求項５３に記載のポリペプチドをコードする配列を有するヌクレオチド、

ｉｉｉ）配列番号１～２５、４０～４３、４６、または４７のうちのいずれか１つに提供される配列にハイブリダイズするヌクレオチド、および

ｉｖ）油糧種子植物の種子内に発現させる場合、請求項５２または請求項５３に記載の少なくとも１つのポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減少させるような配列を有するヌクレオチド、のうちの１つ以上を含む、単離されたおよび／または外因性ポリヌクレオチド。

【請求項５５】

アンチセンスポリヌクレオチド、センスポリヌクレオチド、触媒ポリヌクレオチド、マイクロＲＮＡ、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）分子、またはその処理されたＲＮＡ生成物から選択される、請求項５４のｉｖ）部に記載のポリヌクレオチド。

【請求項５６】

ｄｓＲＮＡ分子、またはその処理されたＲＮＡ生成物であり、配列番号１～２５、４０～４３、４６、４７、または４９～５１（チミン（Ｔ）がウラシル（Ｕ）である）のうちのいずれか１つ以上の相補体と少なくとも９５％同一である少なくとも１９個の連続ヌクレオチドを含む、請求項５５に記載のポリヌクレオチド。

【請求項５７】

前記ｄｓＲＮＡ分子が、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）前駆体である、および／または前記その処理されたＲＮＡ生成物がｍｉＲＮＡである、請求項５５または請求項５６に記載のポリヌクレオチド。

【請求項５８】

単一のプロモーターの制御下で、発育中の油糧種子またはベニバナ種子において転写され、前記ｄｓＲＮＡ分子が、ハイブリダイズすることができる相補的センスおよびアンチセンス配列を含み、一本鎖ＲＮＡ領域によって連結される、請求項５５～５７のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項５９】

発育中のベニバナ種子中で存在する場合、

ｉ）前記発育中の種子においてオレイン酸塩Δ１２デサチュラーゼ（ＦＡＤ２）をコードする内因性遺伝子の発現を減少させ、前記ＦＡＤ２が、配列番号２７、２８、または３６のうちのいずれか１つ以上に提供される、アミノ酸配列を有する、

ｉｉ）前記発育中の種子においてパルミトイル－ＡＣＰ

13

チオエステラーゼ（ＦＡＴＢ）をコードする内因性遺伝子の発現を減少させ、前記ＦＡＴＢが、配列番号４５に提供される、アミノ酸配列を有する、および／またはｉｉｉ）前記発育中の種子においてω６脂肪酸デサチュラーゼ（ＦＡＤ６）をコードする遺伝子の発現を減少させ、前記ＦＡＤ６が、配列番号４８に提供される、アミノ酸配列を有する、請求項５５～５８のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項６０】

プロモーターに作動可能に連結される、請求項５４～５９のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含むキメラベクター。

【請求項６１】

前記プロモーターが、油糧種子において機能的であるか、または種子特異的なプロモーターであり、好ましくは発育中の油糧種子の胚において選択的に発現される、請求項６０に記載のベクター。

【請求項６２】

請求項５４～５９のいずれか一項に記載の外因性ポリヌクレオチド、および／または請求項６０または請求項６１に記載のベクターを含む、組み換え細胞。

【請求項６３】

植物細胞、好ましくは植物種子細胞である、請求項６２に記載の細胞。

【請求項６４】

前記植物細胞が、油糧種子植物細胞である、請求項６３に記載の細胞。

【請求項６５】

前記植物細胞が、非光合成の種子細胞、好ましくは、ベニバナ、ヒマワリ、綿、またはトウゴマの種子細胞である、請求項６４に記載の細胞。

【請求項６６】

請求項５４～５９のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドのうちの１つ以上、請求項６０または請求項６１に記載のベクター、および請求項６２～６５のいずれか一項に記載の細胞を含む、非ヒトトランスジェニック生物。

【請求項６７】

植物である、請求項６６に記載のトランスジェニック非ヒト生物。

【請求項６８】

油糧種子植物である、請求項６７に記載のトランスジェニック非ヒト生物。

【請求項６９】

細胞に、請求項５４～５９のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、および／または請求項６０または請求項６１に記載のベクターを導入するステップを含む、請求項６２～６５のいずれか一項に記載の細胞を生成する方法。

【請求項７０】

14

組み換え細胞を生成するための、請求項５４～５９のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、および／または請求項６０または請求項６１に記載のベクターの使用。

【請求項７１】

請求項２７～４９のいずれか一項に記載の種子を生成するトランスジェニック油糧種子植物またはその種子を生成する方法であって、

ｉ）油糧種子植物の細胞に、請求項５４（ｉｖ部））～５９のいずれか一項に記載の少なくとも１つのポリヌクレオチド、および／または請求項６０または請求項６１に記載の少なくとも１つのベクターを導入することと、

ｉｉ）前記細胞からトランスジェニック植物を再生することと、

ｉｉｉ）前記トランスジェニック植物から１つ以上の子孫植物またはその種子を任意に生成し、

それによって、前記トランスジェニック油糧種子植物またはその種子を生成することと、を含む、方法。

【請求項７２】

前記種子が、請求項２８～４９のいずれか一項に記載のベニバナ種子である、請求項７１に記載の方法。

【請求項７３】

前記１つ以上の子孫植物またはその種子が、

ｉ）前記第１の外因性ポリヌクレオチド、および／または

ｉｉ）前記第２の外因性ポリヌクレオチド、および／または

ｉｉｉ）前記第３の外因性ポリヌクレオチド、

好ましくは、３つすべての外因性ポリヌクレオチドを含む、請求項７１または請求項７２に記載の方法。

【請求項７４】

前記１つ以上の子孫植物またはその種子が、請求項４０～４６のいずれか一項に定義される、１つ以上の突然変異体を含む、請求項７１～７３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７５】

油糧種子植物を得る方法であって、

ｉ）請求項５４（ｉｖ部）～５９のいずれか一項に記載の第１のポリヌクレオチド、または請求項６０または請求項６１に記載の第１のベクターを含む第１の親の油糧種子植物を、請求項５４（ｉｖ部）～５９のいずれか一項に記載の第２のポリヌクレオチド、または請求項６０または請求項６１に記載の第１のベクターを含む第２の親の油糧種子植物と交配させることと、

ｉｉ）前記交配からの子孫植物を両方のポリヌクレオチドまたは両方のベクターの存在についてスクリーニングすることと、

ｉｉｉ）（ａ）前記第１のポリヌクレオチドもしくは前記第１のベクター、および（ｂ）前記第２のポリヌクレオチドもしくは前記第２のベクターの両方を含み、植物の種子の油含有物中の増加したオレイン酸の比率、およ

15

び減少したパルミチン酸の比率をさらに有する、子孫植物を選択することと、を含む、方法。

【請求項７６】

ベニバナ植物の遺伝子型を決定する方法であって、前記植物の核酸分子を検出することを含み、前記核酸分子がベニバナ植物のＣｔＦＡＤ２－１、ＣｔＦＡＤ２－２、またはＣｔＦＡＤ２－１０遺伝子のうちの１つ以上に連結される、および／またはその少なくとも一部を含む、方法。

【請求項７７】

前記植物のＣｔＦＡＤ２－１、ＣｔＦＡＤ２－２、またはＣｔＦＡＤ２－１０遺伝子のうちの１つ以上の発現レベル、および／またはその配列を決定することを含む、請求項７６に記載の方法。

【請求項７８】

ｉ）第２の核酸分子を、前記植物の前記核酸分子にハイブリダイズすることと、

ｉｉ）少なくとも１つの他の核酸分子を、前記植物の前記核酸分子に任意にハイブリダイズすることと、

ｉｉｉ）前記ハイブリダイズするステップ（複数を含む）の生成物、または前記ハイブリダイズするステップ（複数を含む）からの生成物の不在を検出することと、を含む、請求項７６または請求項７７に記載の方法。

【請求項７９】

前記第２の核酸分子が、前記植物の前記核酸分子の少なくとも一部を逆転写または複製するためのプライマーとして使用される、請求項７８に記載の方法。

【請求項８０】

前記核酸が、制限断片長多型分析、増幅断片長多型分析、マイクロサテライト増幅、核酸配列決定、および／または核酸増幅から成る群から選択される手法を使用して検出される、請求項７６～７９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８１】

ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子の対立遺伝子、好ましくは前記ｏｌ対立遺伝子の存在または不在を検出する、請求項７６～８０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８２】

ベニバナ植物集団からベニバナ植物を選択する方法であって、

ｉ）請求項７６～８１のいずれか一項に記載の方法を使用して、前記植物集団の遺伝子型を決定することであって、前記植物集団が２つの植物間の交配から得られ、このうちの少なくとも１つの植物がＣｔＦＡＤ２－１、ＣｔＦＡＤ２－２、もしくはＣｔＦＡＤ２－１０遺伝子の対立遺伝子を含み、前記植物の種子の発育中、前記対立遺伝子を欠失しているベニバナ植物の対応する種子と比較して、Δ１２デサチュラーゼ活性レベルの低下をもたらす、前記植物集団の遺伝子型を決定することと、

ｉｉ）前記対立遺伝子の存在または不在に基づいて前記

16

ベニバナ植物を選択することと、を含む、方法。

【請求項８３】

ＣｔＦＡＤ２－１、ＣｔＦＡＤ２－２、またはＣｔＦＡＤ２－１０遺伝子の対立遺伝子を、前記対立遺伝子を欠失しているベニバナ植物に導入する方法であって、

ｉ）第１の親のベニバナ植物を第２の親のベニバナ植物と交配させることであって、前記第２の植物が、ＣｔＦＡＤ２－１、ＣｔＦＡＤ２－２、またはＣｔＦＡＤ２－１０遺伝子の前記対立遺伝子を含む、交配させることと、

ｉｉ）ステップｉ）の前記交配の子孫を、前記第１の親の植物と同じ遺伝子型の植物と、前記第１の親の遺伝子型の大部分を有するが、前記対立遺伝子を含む植物を生成するために十分な回数戻し交配することと、を含み、前記対立遺伝子が、前記植物の種子の発育中、前記対立遺伝子を欠失しているベニバナ植物の対応する種子と比較して、Δ１２デサチュラーゼ活性レベルの低下をもたらし、子孫植物は、請求項７６～８１のいずれか一項に記載の方法を使用して、前記対立遺伝子の存在または不在について遺伝子型が決定される、方法。

【請求項８４】

請求項７１～８３のいずれか一項に記載の方法を使用して生成される、トランスジェニック植物、またはその子孫植物、またはその種子。

【請求項８５】

種子を生成する方法であって、

ａ）請求項５０、５１、６７、６８、または８４のいずれか一項に記載の植物を、好ましくは、少なくとも１０００のそのような植物集団の一部として領域内で生育させることと、

ｂ）前記種子を収穫することと、を含む、方法。

【請求項８６】

請求項２５～４９のいずれか一項に記載の油糧種子またはベニバナ種子から、請求項５０、５１、６７、６８、または８４のいずれか一項に記載の植物もしくはその一部から、請求項６２～６５のいずれか一項に記載の細胞から、および／または請求項６６に記載の非ヒトトランスジェニック生物もしくはその一部から、請求項１５～２４のいずれか一項に記載のプロセスのうちの１つ以上によって得られた、または得ることが可能な油。

【請求項８７】

請求項１～１２のいずれか一項に記載の脂質、請求項２５～４９のいずれか一項に記載の油糧種子またはベニバナ種子、請求項５２または請求項５３に記載のポリペプチド、請求項５４～５９のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、請求項６０または請求項６１に記載のベクター、請求項６２～６５のいずれか一項に記載の宿主細胞、あるいは請求項８６に記載の油、ならびに１つ以上の許容される担体、のうちの１つ以上を含む組成物。

【請求項８８】

17

工業生成物の製造のための、請求項１～１２のいずれか一項に記載の脂質、請求項１３、１４、または８７に記載の組成物、請求項１５～２４のいずれか一項に記載のプロセス、請求項２５～４９のいずれか一項に記載の油糧種子もしくはベニバナ種子、請求項５０、５１、６７、６８、または８４のいずれか一項に記載の植物もしくはその一部、請求項６２～６５のいずれか一項に記載の宿主細胞、請求項６６に記載の非ヒトトランスジェニック生物もしくはその一部、または請求項８６に記載の油、のうちの１つ以上の使用。

【請求項８９】

工業生成物を生成するためのプロセスであって、

ｉ）請求項１～１２のいずれか一項に記載の脂質、請求項１３、１４、または８７に記載の組成物、請求項２５～４９のいずれか一項に記載の油糧種子もしくはベニバナ種子、請求項５０、５１、６７、６８、または８４のいずれか一項に記載の植物もしくはその一部、請求項６２～６５のいずれか一項に記載の宿主細胞、請求項６６に記載の非ヒトトランスジェニック生物もしくはその一部、または請求項８６に記載の油、のうちの１つ以上を得るステップと、

ｉｉ）ステップｉ）の、請求項１～１２のいずれか一項に記載の脂質、請求項１３、１４、または８７に記載の組成物、請求項２５～４９のいずれか一項に記載の油糧種子もしくはベニバナ種子、請求項５０、５１、６７、６８、または８４のいずれか一項に記載の植物もしくはその一部、請求項６２～６５のいずれか一項に記載の宿主細胞、請求項６６に記載の非ヒトトランスジェニック生物もしくはその一部、または請求項８６に記載の油、のうちの１つ以上を任意に物理的に処理するステップと、

ｉｉ）請求項１～１２のいずれか一項に記載の脂質、または請求項１３、１４、または８７に記載の組成物のうちの１つ以上の脂質、請求項２５～４９のいずれか一項に記載の油糧種子もしくはベニバナ種子、請求項５０、５１、６７、６８、または８４のいずれか一項に記載の植物もしくはその一部、請求項６２～６５のいずれか一項に記載の宿主細胞、請求項６６に記載の非ヒトトランスジェニック生物もしくはその一部、または請求項８６に記載の油、またはステップｉｉ）の物理的に処理された生成物の少なくとも一部を、熱、化学、もしくは酵素的方法、またはそれらの任意の組み合わせを脂質に適用することによって、工業生成物に変換するステップと、

ｉｉｉ）前記工業生成物を回収し、

それによって、前記工業生成物を生成するステップと、

を含む、プロセス。

【請求項９０】

燃料を生成する方法であって、

ｉ）請求項１～１２のいずれか一項に記載の脂質、または請求項１３、１４、または８７に記載の組成物のうち

18

の１つ以上の脂質、請求項２５～４９のいずれか一項に記載の油糧種子もしくはベニバナ種子、請求項５０、５１、６７、６８、または８４のいずれか一項に記載の植物もしくはその一部、請求項６２～６５のいずれか一項に記載の宿主細胞、または請求項６６に記載の非ヒトトランスジェニック生物もしくはその一部、または請求項８６に記載の油、のうちの１つ以上を、アルコールと任意に触媒の存在下で反応させて、アルキルエステルを生成することと、

ｉｉ）任意に、前記アルキルエステルを石油燃料と混合することと、を含む、方法。

【請求項９１】

前記アルキルエステルが、メチルエステルである、請求項９０に記載の方法。

【請求項９２】

飼料を生成する方法であって、請求項１～１２のいずれか一項に記載の脂質、請求項１３、１４、または８７に記載の組成物、請求項２５～４９のいずれか一項に記載の油糧種子もしくはベニバナ種子、請求項５０、５１、６７、６８、または８４のいずれか一項に記載の植物もしくはその一部、請求項６２～６５のいずれか一項に記載の宿主細胞、請求項６６に記載の非ヒトトランスジェニック生物もしくはその一部、または請求項８６に記載の油のうちの１つ以上を、少なくとも１つの他の植物成分と混合することを含む、方法。

【請求項９３】

請求項１～１２のいずれか一項に記載の脂質、請求項１３、１４、または８７に記載の組成物、請求項２５～４９のいずれか一項に記載の油糧種子もしくはベニバナ種子、請求項５０、５１、６７、６８、または８４のいずれか一項に記載の植物もしくはその一部、請求項６２～６５のいずれか一項に記載の宿主細胞、請求項６６に記載の非ヒトトランスジェニック生物もしくはその一部、または請求項８６に記載の油、のうちの１つ以上を反応させることを含む、飼料、化粧品、または化学物質。

【請求項９４】

請求項１～１２のいずれか一項に記載の脂質、請求項１３、１４、または８７に記載の組成物のうちの１つ以上の脂質、請求項１５～２４のいずれか一項に記載のプロセス、請求項２５～４９のいずれか一項に記載の油糧種子もしくはベニバナ種子、請求項５０、５１、６７、６８、または８４のいずれか一項に記載の植物もしくはその一部、請求項６２～６５のいずれか一項に記載の宿主細胞、請求項６６に記載の非ヒトトランスジェニック生物もしくはその一部、または請求項８６に記載の油、のうちの１つ以上から生成された、またはそれらを使用する、生成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

19

本発明は、高レベル、例えば、９０重量%～９５重量%のオレイン酸を含む抽出された脂質に関する。本発明はまた、概して、遺伝的に修飾された植物、具体的には、脂質を生成するために使用することができるベニバナ等の油糧種子を提供する。さらに、脂質を生成するために使用することができる植物の遺伝子型を決定し、選択するための方法が提供される。

【背景技術】

【０００２】

植物油は、ヒトのための食事脂肪の重要な供給源であり、先進国では、カロリー摂取量の約２５%を占める（Ｂｒｏｕｎ ｅｔ ａｌ．，１９９９）。植物油の世界生産量は、年間少なくとも約１億１０００万トンであり、そのうち８６%がヒトの消費のために使用される。これらの油のほとんどすべてが、油糧種子作物、例えば、大豆、ナタネ、ベニバナ、ヒマワリ、綿実、および落花生、または栽培樹木、例えば、パーム、オリーブ、およびココナツから得られる（Ｇｕｎｓｔｏｎｅ，２００１、Ｏｉｌ Ｗｏｒｌｄ Ａｎｎｕａｌ，２００４）。ヒトの健康の様々な様相における食用油の個々の脂肪酸成分の影響についての科学的理解および社会的認識の高まりは、様々な食品適用のための必要な機能性を保持しながら改善された栄養価を有する改変植物油の開発を促している。これらの改変は、植物脂肪酸合成のための代謝経路およびこれらの経路のための酵素をコードする遺伝子についての知識を必要とする（Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．，２００２ａ、Ｔｈｅｌｅｎ ａｎｄ Ｏｈｌｒｏｇｇｅ，２００２）。

【０００３】

様々な脂肪および油の栄養的影響、具体的には、心臓血管疾患、癌、および様々な炎症状態への脂肪および油の成分の影響に多大な関心が寄せられている。食事中の高レベルのコレステロールおよび飽和脂肪酸は、心臓病のリスクを増加させると考えられており、これは、コレステロールに富む飽和動物性脂肪の消費を抑え、コレステロールが含まれていない不飽和植物油を推奨する栄養アドバイスを導いた（Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．，２００２ａ）。

【０００４】

動物性脂肪中に存在するコレステロールの食事摂取は血液中の総コレステロールのレベルを有意に上昇させ得るが、脂肪および油を含む脂肪酸それ自体が、血清コレステロールレベルに有意な影響を及ぼし得ることも見出された。特に、興味深いのは、血液中の望ましくない低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）および望ましい高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）形態のコレステロールへの食事性脂肪酸の影響である。一般に、飽和脂肪酸、特に、植物油中に存在する主要飽和脂肪酸である特定のミリスチン酸（１４：０）およびパルミチン酸（１６：０）が、血清ＬＤＬ－コレステロールレベルを上昇させ、その結果

20

として、心臓血管疾患のリスクを上昇させる望ましくない特性を有する（Ｚｏｃｋ ｅｔ ａｌ．，１９９４、Ｈｕ ｅｔ ａｌ．，１９９７）。しかしながら、植物油中に存在する他の主要な飽和物であるステアリン酸（１８：０）がＬＤＬ－コレステロールを上昇させず、実際には総コレステロールを低下させ得ることは広く確立されている（Ｂｏｎａｎｏｍｅａｎｄ Ｇｒｕｎｄｙ，１９８８、Ｄｏｕｇｈｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．，１９９５）。

したがって、ステアリン酸は、概して、心臓血管疾患のリスクに関して少なくとも中立であると見なされている（Ｔｈｏｌｓｔｒｕｐ，ｅｔ ａｌ．，１９９４）。一方、一価不飽和オレイン酸（１８：１）等の不飽和脂肪酸は、ＬＤＬ－コレステロールを低下させるという有益な特性を有し（Ｍｅｎｓｉｎｋ ａｎｄ Ｋａｔａｎ，１９８９、Ｒｏｃｈｅａｎｄ Ｇｉｂｎｅｙ，２０００）、それ故に、心臓血管疾患のリスクを低減する。

【０００５】

オレイン酸が多い油はまた、多くの場合、脂肪酸エステルの形態である潤滑油、バイオ燃料、脂肪アルコールの原材料、可塑剤、ワックス、ステアリン酸金属塩、乳化剤、パーソナルケア製品、石鹸および洗剤、界面活性剤、製剤、金属加工添加剤、柔軟剤の原材料、インク、透明石鹸、ＰＶＣ安定剤、アルキド樹脂、および多くの他の種類の下流油脂化学誘導体の媒介物等が含まれるが、これらに限定されない、多くの工業的用途を有する。

【０００６】

油の製造加工業者および食品製造業者は、油中の不飽和脂肪酸のレベルを低下させるために伝統的に水素化に依存しており、それによって、フライ適用における酸化安定性を上昇させ、また、マーガリンおよびショートニングにおける使用のための固形脂肪を供給する。水素化は、炭素－炭素の二重結合を炭素－炭素の一重結合に変換することによって油の不飽和度を低下させる化学プロセスである。完全加水分解は、完全に飽和した脂肪を生成する。しかしながら、部分水素化の工程は、飽和脂肪酸および一価不飽和脂肪酸の両方のレベルの上昇をもたらす。部分水素化中に形成される一価不飽和物のいくつかは、天然のシス異性体ではなく、トランス異性体形態（例えば、エライジン酸、オレイン酸のトランス異性体）である（Ｓｅｂｅｄｉｏ ｅｔ ａｌ．，１９９４、Ｆｅｒｎａｎｄｅｚ Ｓａｎ Ｊｕａｎ，１９９５）。シス不飽和脂肪酸とは対照的に、現在では、トランス脂肪酸は、血清ＬＤＬコレステロール値を上昇させ（Ｍｅｎｓｉｎｋ ａｎｄ Ｋａｔａｎ，１９９０、Ｎｏａｋｅｓ ａｎｄ Ｃｌｉｆｔｏｎ，１９９８）、血清ＨＤＬコレステロールを低下させる（Ｚｏｃｋ ａｎｄ Ｋａｔａｎ，１９９２）上で、パルミチン酸と同程度に強力であることが知られており、それ故に、心臓血管疾患のリスクの増加に寄与する（Ａｓｃｈｅｒｉｏ ａｎｄ

21

Ｗｉｌｌｅｔｔ，１９９７）。トランス脂肪酸の栄養阻害作用の認識の高まりの結果として、現在食品産業では、水素化油の使用を避け、栄養的に有益であり、水素化を必要とせずに必要な機能性を提供し得る脂肪および油、特に、液体油が必要とされるオレイン酸または固体もしくは半固体脂肪が好ましいステアリン酸のいずれかに富むものを支持する傾向が高まりつつある。

【０００７】

高オレイン酸含量およびその供給源を有するさらなる脂質および油の必要がある。

【発明の概要】

【０００８】

本発明者らは、新規の脂質組成物、およびこれらの脂質を生成する方法を生み出した。

【０００９】

第一の態様において、本発明は、油糧種子から抽出される脂質を提供し、この脂質は、グリセロールにエステル化された脂肪酸から成るトリアシルグリセロール（ＴＡＧ）を含み、

ｉ）脂肪酸がパルミチン酸およびオレイン酸を含み、

ｉｉ）脂質の少なくとも９５重量%がＴＡＧであり、

ｉｉｉ）脂質の全脂肪酸含量の約９０重量%～約９５重量%がオレイン酸であり、

ｉｖ）脂質の全脂肪酸含量の約３．１重量%未満がパルミチン酸であり、

ｖ）脂質は約０．０３７未満のオレイン酸不飽和化係数（ＯＤＰ）および／または約０．０６３未満のパルミチン酸－リノール酸－オレイン酸の値（ＰＬＯ）を有する。

【００１０】

一実施形態において、脂質は、以下の特徴のうちの１つ以上またはすべてを有する。

ａ）脂質の全脂肪酸含量の約９０重量%～約９４重量%、または約９１重量%～約９４重量%、または約９１重量%～約９２重量%、または約９２重量%、または約９３重量%がオレイン酸である、

ｂ）脂質の全脂肪酸含量の約３重量%未満、または約２．７５重量%未満、または約２．５重量%未満、または約３重量%、または約２．７５重量%、または約２．５重量%、または約２．３重量%がパルミチン酸である、

ｃ）脂質の全脂肪酸含量の約０．１重量%～約３重量%、または約２重量%～約３重量%、または約３重量%、または約２重量%が多価不飽和脂肪酸（ＰＵＦＡ）である、

ｄ）脂質の全脂肪酸含量の約３重量%未満、または約２．５重量%未満、または約２．２５重量%未満、または約３重量%、または約２．５重量%、または約２．２５重量%がリノール酸である、

ｅ）脂質の全脂肪酸含量の約１重量%未満、または約０．５重量%未満がα－リノレン酸（ＡＬＡ）である、

22

ｆ）脂質の全脂肪酸含量の約０．５重量%～約１重量%が１８：１Δ１１である、

ｇ）脂質の全脂肪酸含量のＯＤＰは約０．０３３～約０．０１、または約０．０３３～約０．０１６、または約０．０３３～約０．０２３であるか、または約０．０３、または約０．０２、または約０．０１である、

ｈ）脂質の全脂肪酸含量のＰＬＯ値が、約０．０２０～約０．０６３、または約０．０２０～約０．０５５、または約０．０２０～約０．０５０、または約０．０５０～約０．０５５、または約０．０６３、または約０．０５５、または約０．０５０、または約０．０４０、または約０．０３０、または約０．０２０である、

ｉ）脂質の全脂肪酸含量の約９０重量%～約９６重量%、または約９２重量%～約９６重量%、または約９３重量%、または約９４重量%が、一価不飽和脂肪酸である、

ｊ）脂質は、約０．０２未満、または約０．０１５未満、または約０．００５～約０．０２のオレイン酸一価不飽和率（ＯＭＰ）を有する、

ｋ）脂質は、精製油の形態である、

ｌ）脂質は水素化されていない。

【００１１】

一実施形態において、

１）脂質の全脂肪酸含量の約９１重量%～約９４重量%がオレイン酸である、

２）脂質の全脂肪酸含量の約２．７５重量%未満がパルミチン酸である、

３）脂質の全脂肪酸含量の約３重量%未満がリノール酸である、

４）α－リノレン酸は、脂質の脂肪酸含量中で検出不能である、

５）脂質の脂肪酸含量のＯＤＰは、約０．０３３～約０．０２３、または約０．０３３～約０．０１８である、

６）脂質の脂肪酸含量のＰＬＯ値が、約０．０２０～約０．０６３である、

７）脂質の全脂肪酸含量の約９６重量%、または約９３重量%、または約９４重量%が、一価不飽和脂肪酸である、

８）脂質は、約０．０２未満、または約０．０１５未満、または約０．００５～約０．０２のオレイン酸一価不飽和率（ＯＭＰ）を有する。

【００１２】

さらなる実施形態において、

１）脂質の全脂肪酸含量の約９１重量%～約９４重量%がオレイン酸である、

２）脂質の全脂肪酸含量の約２．７５重量%未満がパルミチン酸である、

３）脂質の全脂肪酸含量の約３重量%未満がリノール酸である、

４）α－リノレン酸は、脂質の脂肪酸含量中で検出不能

23

である、
５）脂質の全脂肪酸含量の約９６重量%、または約９３重量%、または約９４重量%が、一価不飽和脂肪酸である、および
６）脂質は、約０．０２未満、または約０．０１５未満、または約０．００５～約０．０２のオレイン酸一価不飽和率（ＯＭＰ）を有する。
【００１３】
一実施形態において、ＰＵＦＡはリノール酸である。
【００１４】
一実施形態において、α－リノレン酸は、脂質の脂肪酸含量中で検出不能である。
【００１５】
さらなる実施形態において、脂質のＴＡＧ含量の約５５%～約８０%、または約６０%～約８０%、または約７０%～約８０%、または少なくとも約６０%、または少なくとも約７０%、または約６０%、または約７０%、または約８０%は、トリオレインである。
【００１６】
別の実施形態において、脂質のオレイン酸含量の約５%未満、または約２%未満、または約０．１%～約５%は、ジアシルグリセロール（ＤＡＧ）の形態である。
【００１７】
さらなる実施形態において、脂質は、油の形態であり、油の少なくとも９０重量%、または最も少なくて９５重量%、少なくとも約９８重量%、または約９５重量%～約９８重量%は、脂質である。
【００１８】
好ましい実施形態において、油糧種子は、非光合成の油糧種子である。非光合成の油糧種子の例には、ベニバナ、ヒマワリ、綿、またはトウゴマからの種子が含まれるが、必ずしもこれらに限定されない。好ましい実施形態において、非光合成の油糧種子は、ベニバナ種子である。
【００１９】
一実施形態において、脂質は、１つ以上のステロールをさらに含む。
【００２０】
さらなる実施形態において、脂質は、油の形態であり、油の約５ｍｇのステロール／ｇ（油）、または約１．５ｍｇのステロール／ｇ（油）～約５ｍｇのステロール／ｇ（油）を含む。
【００２１】
一実施形態において、脂質は、
ａ）全ステロール含量の約１．５%～約４．５%、または約２．３%～約４．５%がエルゴスト－７－エン－３β－オールである、
ｂ）全ステロール含量の約０．５%～約３%、または約１．５%～約３%がトリテルペノイドアルコールである、

24

ｃ）全ステロール含量の約８．９%～約２０%がΔ７－スチグマステロール／スチグマスト－７－エン－３β－オールである、および
ｄ）全ステロール含量の約１．７%～約６．１%がΔ７－アベナステロールである、のうちの１つ以上またはすべてを含む。
【００２２】
さらなる実施形態において、脂質は、少なくとも１リットルの体積および／もしくは少なくとも１ｋｇの重量を有する、ならびに／または野外生育植物から得られた油糧種子から抽出されている。
【００２３】
一実施形態において、脂質は、粉砕することによって油糧種子から抽出され、約７重量%未満の水を含む。別の実施形態において、脂質は、精製された脂質（溶媒抽出され、純化された）であり、約０．１重量%未満、または約０．０５重量%未満の水を含む。
【００２４】
別の態様において、本発明は、本発明の脂質である第１の成分と、第２の成分とを含む組成物を提供し、好ましくは、この組成物は、脂質を第２の成分と混合することによって生成された。
【００２５】
当業者であれば、第２の成分が、広範囲の様々な化合物／組成物から選択することができることを理解されよう。一例では、第２の成分は、酵素等の非脂質物質、非タンパク質（非酵素）触媒もしくは化学物質（例えば、水酸化ナトリウム、メタノール、もしくは金属）、または食餌の１つ以上の材料である。
【００２６】
本発明はまた、油を生成するためのプロセスも提供し、本プロセスは、
ｉ）油を含む、および／または油を含む油糧種子を生成する植物を生成することができる油糧種子を得ることであって、油糧種子の油含有物は本明細書に定義されるような脂質である、油糧種子を得ることと、
ｉｉ）油糧種子から油を抽出し、それによって油を生成することと、を含む。
【００２７】
好ましい実施形態において、油糧種子は、第１の外因性ポリヌクレオチドを欠失している対応する油糧種子と比較して、発育中の油糧種子においてΔ１２デサチュラーゼ（ＦＡＤ２）遺伝子の発現を減少させることができる第１のサイレンシングＲＮＡをコードする第１の外因性ポリヌクレオチドを含み、このポリヌクレオチドは、発育中の油糧種子においてポリヌクレオチドの発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結される。
【００２８】
別の態様において、本発明は、油を生成するプロセスを提供し、本プロセスは、

25

ｉ）油含有物がグリセロールにエステル化された脂肪酸から成るトリアシルグリセロール（ＴＡＧ）を含み、および／または油含有物がグリセロールにエステル化された脂肪酸から成るトリアシルグリセロール（ＴＡＧ）を含む種子を生成する植物を生成することができ、
ａ）脂肪酸がパルミチン酸およびオレイン酸を含み、
ｂ）種子の油含有物の少なくとも９５重量%がＴＡＧであり、
ｃ）種子の油含有物の全脂肪酸の約７５重量%～約９５重量%がオレイン酸であり、
ｄ）種子の油含有物の全脂肪酸の約５．１重量%未満がパルミチン酸であり、
ｅ）種子の油含有物は、約０．１７未満のオレイン酸不飽和率（ＯＤＰ）、および／または約０．２６未満のパルミチン酸－リノール酸－オレイン酸（ＰＬＯ）値を有する、ベニバナ種子を得ることと、
ｉｉ）ベニバナ種子から油を抽出し、それによって油を生成することと、を含み、
ベニバナ種子が、第１の外因性ポリヌクレオチドを欠失している対応するベニバナ種子と比較して、発育中のベニバナ種子においてΔ１２デサチュラーゼ（ＦＡＤ２）遺伝子の発現を減少させることができる第１のサイレンシングＲＮＡをコードする第１の外因性ポリヌクレオチドを含み、このポリヌクレオチドは、発育中のベニバナ種子においてポリヌクレオチドの発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結される。

【００２９】

一実施形態において、油糧種子またはベニバナ種子は、第２の外因性ポリヌクレオチドを欠失している対応する油糧種子またはベニバナ種子と比較して、発育中の油糧種子またはベニバナ種子においてパルミトイル－ＡＣＰチオエステラーゼ（ＦＡＴＢ）遺伝子の発現を減少させることができる第２のサイレンシングＲＮＡをコードする第２の外因性ポリヌクレオチドを含み、第２の外因性ポリヌクレオチドは、発育中の油糧種子またはベニバナ種子においてポリヌクレオチドの発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結される。

【００３０】

別の実施形態において、油糧種子またはベニバナ種子は、第３の外因性ポリヌクレオチドを欠失している対応する油糧種子またはベニバナ種子と比較して、発育中の油糧種子またはベニバナ種子において色素体ω６脂肪酸デサチュラーゼ（ＦＡＤ６）遺伝子の発現を減少させることができる第３のサイレンシングＲＮＡをコードする第３の外因性ポリヌクレオチドを含み、第３の外因性ポリヌクレオチドは、発育中の油糧種子またはベニバナ種子においてポリヌクレオチドの発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結される。

【００３１】

一実施形態において、

26

１）ＦＡＤ２遺伝子は、ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子、ＣｔＦＡＤ２－２遺伝子、およびＣｔＦＡＤ２－１０遺伝子、好ましくはＣｔＦＡＤ２－１遺伝子および／またはＣｔＦＡＤ２－２遺伝子のうちの１つ以上またはそれぞれである、ならびに／または
２）ＦＡＴＢ遺伝子は、ＣｔＦＡＴＢ－３遺伝子である、ならびに／または
３）ＦＡＤ６遺伝子は、ＣｔＦＡＤ６遺伝子である。

【００３２】

一実施形態において、ベニバナ種子の油含有物は、、以下の特徴のうちの１つ以上またはすべてを有する。
ａ）種子の油含有物の全脂肪酸の約８０重量%～約９４重量%、または約８５重量%～約９４重量%、または約９０重量%～約９４重量%、または約９１重量%～約９４重量%、または約９１重量%～約９２重量%、または約９２重量%、または約９３重量%が、オレイン酸である、
ｂ）種子の油含有物の全脂肪酸の約５重量%未満、または約４重量%未満、または約３重量%未満、または約２．７５重量%未満、または約２．５重量%未満、または約３重量%、または約２．７５重量%、または約２．５重量%が、パルミチン酸である、
ｃ）種子の油分の全脂肪酸の約０．１重量%～約１５重量%、または約０．１重量%～約１０重量%、または約０．１重量%～約７．５重量%、または約０．１重量%～約５重量%、または約０．１重量%～約３重量%、または約２重量%～約３重量%、または約３重量%、または約２重量%が、多価不飽和脂肪酸（ＰＵＦＡ）である、
ｄ）種子の油分の全脂肪酸の約１５重量%未満、または約１０重量%未満、または約５重量%未満、または約３重量%未満、または約２．５重量%未満、または約２．２５重量%未満、または約３重量%、または約２．５重量%、または約２．２５重量%が、リノール酸（ＬＡ）である、
ｅ）脂質の全脂肪酸含量の約８０重量%～約９６重量%、または約９０重量%～約９６重量%、または約９２重量%～約９６重量%、または約９３重量%、または約９４重量%が、一価不飽和脂肪酸である、
ｆ）脂質は、約０．０５未満、または約０．０２未満、または約０．０１５未満、または約０．００５～約０．０５、または約０．００５～約０．０２のオレイン酸一価不飽和率（ＯＭＰ）を有する、
ｇ）種子の油含有物のＯＤＰは、約０．１７～約０．０１、または約０．１５～約０．０１、または約０．１～約０．０１、または約０．０７５～約０．０１、または約０．０５０～約０．０１、または約０．０３３～約０．０１、または約０．０３３～約０．０１６、または約０．０３３～約０．０２３であるか、または約０．０３、または約０．０２、または約０．０１である、

27

ｈ）種子の油含有物のＰＬＯ値が、約０．２０～約０．０２６、または約０．０２０～約０．２、または約０．０２０～約０．１５、または約０．０２０～約０．１、または約０．０２０～約０．０７５、または約０．０５０～約０．０５５、または約０．０５、または約０．０４０、または約０．０３０、または約０．０２０である。

【００３３】

一実施形態において、油を抽出するステップは、油糧種子またはベニバナ種子を粉砕することを含む。

【００３４】

さらに別の実施形態において、本プロセスは、油糧種子またはベニバナ種子から抽出された油を精製するステップをさらに含み、この精製ステップは、抽出された油を脱ガム、脱臭、脱色、乾燥、および／または分留すること、ならびに／あるいは抽出された油からの少なくとも一部の、好ましくは実質的にはすべてのワックスおよび／もしくはワックスエステルを除去すること、から成る群のうちの１つ以上またはすべてを含む。

【００３５】

別の態様において、本発明は、油含有物がグリセロールにエステル化された脂肪酸から成るトリアシルグリセロール（ＴＡＧ）を含み、および／または油含有物がグリセロールにエステル化された脂肪酸から成るトリアシルグリセロール（ＴＡＧ）を含む油糧種子を生成する植物を生成することができる油糧種子を提供し、

ｉ）脂肪酸がパルミチン酸およびオレイン酸を含み、

ｉｉ）油糧種子の油含有物の少なくとも９５重量％がＴＡＧであり、

ｉｉｉ）油糧種子の油含有物の全脂肪酸の約９０重量％～約９５重量％がオレイン酸であり、

ｉｖ）油糧種子の油含有物の全脂肪酸の約３．１重量％未満がパルミチン酸であり、

ｖ）油糧種子の油含有物は約０．０３７未満のオレイン酸不飽和率（ＯＤＰ）および／または約０．０６３未満のパルミチン酸－リノール酸－オレイン酸（ＰＬＯ）値を有する。

【００３６】

一実施形態において、油糧種子は、非光合成の油糧種子、好ましくは、ベニバナ、ヒマワリ、綿、またはトウゴマ由来の種子である。

【００３７】

別の実施形態において、油糧種子は、外因性ポリヌクレオチドを欠失している対応する油糧種子と比較して、発育中の油糧種子においてΔ１２デサチュラーゼ（ＦＡＤ２）遺伝子の発現を可能にする、または減少させる第１のサイレンシングＲＮＡをコードする第１の外因性ポリヌクレオチドを含み、第１の外因性ポリヌクレオチドは、発育中の油糧種子においてポリヌクレオチドの発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結される。

28

【００３８】

なおさらなる態様において、本発明は、油含有物がグリセロールにエステル化された脂肪酸から成るトリアシルグリセロール（ＴＡＧ）を含み、および／または油含有物がグリセロールにエステル化された脂肪酸から成るトリアシルグリセロール（ＴＡＧ）を含む種子を生成する植物を生成することができるベニバナ種子を提供し、

ｉ）脂肪酸がパルミチン酸およびオレイン酸を含み、

ｉｉ）種子の油含有物の少なくとも９５重量％がＴＡＧであり、

ｉｉｉ）種子の油含有物の全脂肪酸の約７５重量％～約９５重量％がオレイン酸であり、

ｉｖ）種子の油含有物の全脂肪酸の約５．１重量％未満がパルミチン酸であり、

ｖ）種子の油含有物が、約０．１７未満のオレイン酸不飽和率（ＯＤＰ）および／または約０．２６未満のパルミチン酸－リノール酸－オレイン酸（ＰＬＯ）値を有し、

ベニバナ種子は、第１の外因性ポリヌクレオチドを欠失している対応するベニバナ種子と比較して、発育中のベニバナ種子においてΔ１２デサチュラーゼ（ＦＡＤ２）遺伝子の発現を減少させることができる第１のサイレンシングＲＮＡをコードする第１の外因性ポリヌクレオチドを含み、第１の外因性ポリヌクレオチドは、発育中のベニバナ種子においてポリヌクレオチドの発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結される。

【００３９】

一実施形態において、ベニバナ種子の油含有物は、以下の特徴のうちの１つ以上を有する。

ａ）種子の油含有物の全脂肪酸の約８０重量％～約９４重量％、または約８５重量％～約９４重量％、または約９０重量％～約９４重量％、または約９１重量％～約９４重量％、または約９１重量％～約９２重量％、または約９２重量％、または約９３重量％が、オレイン酸である、

ｂ）種子の油含有物の全脂肪酸の約５重量％未満、または約４重量％未満、または約３重量％未満、または約２．７５重量％未満、または約２．５重量％未満、または約３重量％、または約２．７５重量％、または約２．５重量％が、パルミチン酸である、

ｃ）種子の油含有物の全脂肪酸の約０．１重量％～約１５重量％、または約０．１重量％～約１０重量％、または約０．１重量％～約７．５重量％、または約０．１重量％～約５重量％、または約０．１重量％～約３重量％、または約２重量％～約３重量％、または約３重量％、または約２重量％が、多価不飽和脂肪酸（ＰＵＦＡ）である、

ｄ）種子の油分の全脂肪酸の約１５重量％未満、または約１０重量％未満、または約５重量％未満、または約３重量％未満、または約２．５重量％未満、または約２．

29

２５重量%未満、または約３重量%、または約２．５重量%、または約２．２５重量%が、リノール酸（ＬＡ）である、
ｅ）脂質の全脂肪酸含量の約８０重量%～約９６重量%、または約９０重量%～約９６重量%、または約９２重量%～約９６重量%、または約９３重量%、または約９４重量%が、一価不飽和脂肪酸である、
ｆ）脂質が、約０．０５未満、または約０．０２未満、または約０．０１５未満、または約０．００５～約０．０５、または約０．００５～約０．０２のオレイン酸一価不飽和率（ＯＭＰ）を有する、
ｇ）種子の油含有物のＯＤＰが、約０．１７～約０．０１、または約０．１５～約０．０１、または約０．１～約０．０１、または約０．０７５～約０．０１、または約０．０５０～約０．０１、または約０．０３３～約０．０１、または約０．０３３～約０．０１６、または約０．０３３～約０．０２３であるか、または約０．０３、または約０．０２、または約０．０１である、
ｈ）種子の油含有物のＰＬＯ値が、約０．０２０～約０．２６、または約０．０２０～約０．２、または約０．０２０～約０．１５、または約０．０２０～約０．１、または約０．０２０～約０．０７５、または約０．０５０～約０．０５５、または約０．０５０、または約０．０４０、または約０．０３０、または約０．０２０である。

【００４０】

さらなる実施形態において、油糧種子またはベニバナ種子の油含有物は、上述の特徴のうちの１つ以上をさらに特徴とする脂質である。

【００４１】

別の実施形態において、油糧種子またはベニバナ種子は、第２の外因性ポリヌクレオチドを欠失している対応する油糧種子またはベニバナ種子と比較して、発育中の油糧種子またはベニバナ種子においてパルミトイル－ＡＣＰチオエステラーゼ（ＦＡＴＢ）遺伝子の発現を減少させることができる第２のサイレンシングＲＮＡをコードする第２の外因性ポリヌクレオチドを含み、第２の外因性ポリヌクレオチドは、発育中の油糧種子またはベニバナ種子においてポリヌクレオチドの発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結される。

【００４２】

さらなる実施形態において、油糧種子またはベニバナ種子は、第３の外因性ポリヌクレオチドを欠失している対応する油糧種子またはベニバナ種子と比較して、発育中の油糧種子またはベニバナ種子において色素体ω６脂肪酸デサチュラーゼ（ＦＡＤ６）遺伝子の発現を減少させることができる第３の外因性ポリヌクレオチドを含み、第３の外因性ポリヌクレオチドは、発育中の油糧種子またはベニバナ種子においてポリヌクレオチドの発現を誘導するプロモーターに作動可能に連結される。

30

【００４３】

別の実施形態において、第１のサイレンシングＲＮＡは、発育中の油糧種子またはベニバナ種子においてＦＡＤ２をコードする１つを超える外因性遺伝子の発現を減少させる、および／または第２のサイレンシングＲＮＡは、発育中の油糧種子またはベニバナ種子においてＦＡＴＢをコードする１つを超える外因性遺伝子の発現を減少させる。

【００４４】

なおさらなる実施形態において、第１の外因性ポリヌクレオチド、ならびに第２の外因性ポリヌクレオチドおよび第３の外因性ポリヌクレオチドのいずれかまたはその両方は、単一のＤＮＡ分子に、任意に、第１、第２、および／または第３の外因性ポリヌクレオチド間の連結するＤＮＡ配列と共有結合する。

【００４５】

別の実施形態において、第１の外因性ポリヌクレオチド、ならびに第２の外因性ポリヌクレオチドおよび第３の外因性ポリヌクレオチドのいずれかまたはその両方は、単一のプロモーターの制御下にあり、そのため、第１の外因性ポリヌクレオチドおよび第２の外因性ポリヌクレオチドおよび／または第３の外因性ポリヌクレオチドは発育中の油糧種子またはベニバナ種子において転写される場合、第１のサイレンシングＲＮＡおよび第２のサイレンシングＲＮＡおよび／または第３のサイレンシングＲＮＡが単一のＲＮＡ転写物の一部として共有結合する。

【００４６】

別の実施形態において、油糧種子またはベニバナ種子は、油糧種子またはベニバナ種子のゲノムに組み込まれた単一のトランスファーＤＮＡを含み、単一のトランスファーＤＮＡは、第１の外因性ポリヌクレオチド、ならびに第２の外因性ポリヌクレオチドおよび第３の外因性ポリヌクレオチドのいずれかまたはその両方を含む。

【００４７】

好ましくは、油糧種子またはベニバナ種子は、トランスファーＤＮＡにとってホモ接合である。

【００４８】

一実施形態において、第１のサイレンシングＲＮＡ、第２のサイレンシングＲＮＡ、および第３のサイレンシングＲＮＡはそれぞれ独立して、アンチセンスポリヌクレオチド、センスポリヌクレオチド、触媒ポリヌクレオチド、マイクロＲＮＡ、および二本鎖ＲＮＡから成る群から選択される。

【００４９】

さらなる実施形態において、プロモーターのうちのいずれか１つ以上、好ましくはすべてが、種子特異的であり、好ましくは、発育中の油糧種子またはベニバナ種子の胚内において選択的に発現される。

【００５０】

31

別の実施形態において、油糧種子またはベニバナ種子は、１つ以上のＦＡＤ２遺伝子において、１つ以上の突然変異体を含み、この突然変異体（複数を含む）が、突然変異体（複数を含む）を欠失している対応する油糧種子またはベニバナ種子と比較して、発育中の油糧種子またはベニバナ種子において１つ以上のＦＡＤ２遺伝子の活性を軽減させる。

【００５１】

別の実施形態において、油糧種子またはベニバナ種子は、対応する油糧種子またはベニバナ種子において野生型ＦＡＤ２遺伝子と比較して、ＦＡＤ２遺伝子の突然変異体を含み、その突然変異が、欠失、挿入、逆位、フレームシフト、早期翻訳終止コドン、または１つ以上の非保存アミノ酸置換である。

【００５２】

さらなる実施形態において、その突然変異は、ＦＡＤ２遺伝子のヌル突然変異である。

【００５３】

別の実施形態において、突然変異体のうちの少なくとも１つは、発育中の油糧種子またはベニバナ種子において任意の他のＦＡＤ２遺伝子よりも突然変異体（複数を含む）を欠失している発育中の油糧種子またはベニバナ種子においてさらなるＦＡＤ２活性をコードするＦＡＤ２遺伝子内にある。

【００５４】

別の実施形態において、種子はベニバナ種子であり、ＦＡＤ２遺伝子はＣｔＦＡＤ２－１遺伝子である。この実施形態において、第１のサイレンシングＲＮＡは、ＣｔＦＡＤ２－２遺伝子の発現を少なくとも減少させることができる。

【００５５】

別の実施形態において、種子は、ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子のｏｌ対立遺伝子、ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子のｏｌｌ対立遺伝子、または両方の対立遺伝子を含むベニバナ種子である。一実施形態において、ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子のｏｌ対立遺伝子またはｏｌｌ対立遺伝子は、ホモ接合状態で存在する。

【００５６】

別の実施形態において、ＦＡＤ２タンパク質は、油糧種子またはベニバナ種子において検出不能である。

【００５７】

別の実施形態において、種子はベニバナ種子であり、第１のサイレンシングＲＮＡは、ＣｔＦＡＤ２－１およびＣｔＦＡＤ２－２遺伝子の両方の発現を減少させる。

【００５８】

別の実施形態において、種子はベニバナ種子であり、
１）ＦＡＤ２遺伝子が、ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子、ＣｔＦＡＤ２－２遺伝子、およびＣｔＦＡＤ２－１０遺伝子のうちの１つ以上であり、好ましくはＣｔＦＡＤ２－１遺伝子および／またはＣｔＦＡＤ２－２遺伝子である、

32

ならびに／または
２）ＦＡＴＢ遺伝子が、ＣｔＦＡＴＢ－３遺伝子である、ならびに／または
３）ＦＡＤ６遺伝子が、ＣｔＦＡＤ６遺伝子である。

【００５９】

また、本発明の種子を生成することができる油糧種子植物またはベニバナ植物も提供される。

【００６０】

一実施形態において、植物は、トランスジェニックであり、それぞれの外因性ポリヌクレオチドにとってホモ接合である、および／または第１の外因性ポリヌクレオチド、ならびに第２の外因性ポリヌクレオチドまたは第３の外因性ポリヌクレオチドのいずれかまたはその両方を含む。

【００６１】

別の態様において、本発明は、配列番号２７～３７、４４、４５、もしくは４８のうちのいずれか１つに提供される配列、その生物学的に活性な断片、または配列番号２７～３７、４４、４５、もしくは４８のうちのいずれか１つ以上と少なくとも４０％同一であるアミノ酸配列を有するアミノ酸を含む、実質的に精製された、および／または組み換えポリペプチドを提供する。

【００６２】

一実施形態において、脂肪酸を修飾する酵素、好ましくは、オレイン酸塩Δ１２デサチュラーゼ、Δ１２－アセチレナーゼ、パルミトレイン酸塩Δ１２デサチュラーゼ、またがパルミトイル－ＡＣＰチオエステラーゼ（ＦＡＴＢ）である、ポリペプチド。

【００６３】

さらなる態様において、本発明は、単離されたおよび／または外因性ポリヌクレオチドを提供し、
ｉ）配列番号１～２５、４０～４３、４６、または４７のうちのいずれか１つに提供される配列を有するヌクレオチド、
ｉｉ）本発明のポリペプチドをコードする配列を有するヌクレオチド、
ｉｉｉ）配列番号１～２５、４０～４３、４６、または４７のうちのいずれか１つに提供される配列にハイブリダイズするヌクレオチド、
ｉｖ）油糧種子植物の種子内に発現させる場合、本発明の少なくとも１つのポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減少させるような配列を有するヌクレオチド、のうちの１つ以上を含む。

【００６４】

特に好ましい実施形態において、ポリヌクレオチドは、油糧種子植物の種子内に発現させる場合、本発明の少なくとも１つのポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減少させるような配列を有するヌクレオチドヌクレオチドを含む。

【００６５】

33

一実施形態において、ｉｖ）部のポリヌクレオチドは、配列番号４９～５１（チミン（Ｔ）がウラシル（Ｕ）である）のうちのいずれか１つ以上に提供されるヌクレオチドの配列を含む。

【００６６】

一実施形態において、ｉｖ）部のポリヌクレオチドは、アンチセンスポリヌクレオチド、センスポリヌクレオチド、触媒ポリヌクレオチド、マイクロＲＮＡ、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）分子、またはその処理されたＲＮＡ生成物から選択される。

【００６７】

さらなる実施形態において、ポリヌクレオチドは、ｄｓＲＮＡ分子、またはその処理されたＲＮＡ生成物であり、配列番号１～２５、４０～４３、４６、４７、または４９～５１（チミン（Ｔ）がウラシル（Ｕ）である）のうちのいずれか１つ以上の相補体と少なくとも９５％同一である少なくとも１９個の連続ヌクレオチドを含む。

【００６８】

別の実施形態において、ｄｓＲＮＡ分子がマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）前駆体である、および／またはその処理されたＲＮＡ生成物がｍｉＲＮＡである。

【００６９】

なおさらなる実施形態において、ポリヌクレオチドは、単一のプロモーターの制御下で、発育中の油糧種子またはベニバナ種子において転写され、ｄｓＲＮＡ分子が互いにハイブリダイズすることが可能である相補的センスおよびアンチセンス配列を含み、一本鎖ＲＮＡ領域によって連結される。

【００７０】

なおさらなる実施形態において、発育中のベニバナ種子中で存在する場合、ポリヌクレオチドは、

ｉ）発育中の種子においてオレイン酸塩Δ１２デサチュラーゼ（ＦＡＤ２）をコードする内因性遺伝子の発現を減少させ、ＦＡＤ２が、配列番号２７、２８、または３６のうちのいずれか１つ以上、好ましくは、配列番号２７および２８のうちの少なくとも１つまたはその両方に提供される、アミノ酸配列を有する、

ｉｉ）発育中の種子においてパルミトイル－ＡＣＰチオエステラーゼ（ＦＡＴＢ）をコードする内因性遺伝子の発現を減少させ、ＦＡＴＢが、配列番号４５に提供される、アミノ酸配列を有する、および／または

ｉｉｉ）発育中の種子においてω６脂肪酸デサチュラーゼ（ＦＡＤ６）をコードする遺伝子の発現を減少させ、ＦＡＤ６が、配列番号４８に提供される、アミノ酸配列を有する。

【００７１】

また、プロモーターに作動可能に連結される、本発明のポリヌクレオチドを含むキメラベクターも提供される。

【００７２】

一実施形態において、プロモーターは、油糧種子において機能的であるか、または種子特異的なプロモーターであり、好ましくは発育中の油糧種子の胚において選択的に発現される。

34

【００７３】

別の態様において、本発明は、本発明の外因性ポリヌクレオチド、および／または本発明のベクターを含む組み換え細胞を提供する。

【００７４】

細胞は、細菌細胞、酵母細胞、または植物細胞等であるが、これらに限定されない任意の細胞型であり得る。

【００７５】

好ましくは、細胞は、植物細胞、好ましくは植物種子細胞である。より好ましくは、植物細胞は、油糧種子植物細胞である。さらにより好ましくは、植物細胞は、非光合成の種子細胞、好ましくはベニバナ、綿、またはトウゴマの種子細胞である。

【００７６】

別の態様において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドのうちの１つ以上、本発明のベクター、および本発明の細胞を含むトランスジェニック非ヒト生物を提供する。

【００７７】

好ましくは、トランスジェニック非ヒト生物は、植物である。より好ましくは、油糧種子植物。

【００７８】

さらに別の態様において、本発明は、本発明の細胞を生成する方法を提供し、本方法は、細胞に、本発明のポリヌクレオチドおよび／または本発明のベクターを導入するステップを含む。

【００７９】

また、組み換え細胞を生成するための本発明のポリヌクレオチドおよび／または本発明のベクターの使用が提供される。

【００８０】

別の態様において、本発明は、本発明の種子を生成するトランスジェニック油糧種子植物、またはその種子を生成する方法を提供し、本方法は、

ｉ）油糧種子植物の細胞に、本発明の少なくとも１つのポリヌクレオチドおよび／または少なくとも１つの本発明のベクターを導入することと、

ｉｉ）細胞からトランスジェニック植物を再生することと、

ｉｉｉ）トランスジェニック植物から１つ以上の子孫植物またはその種子を任意に生成し、

それによって、トランスジェニック油糧種子植物またはその種子を生成することと、を含む。

【００８１】

一実施形態において、種子は、本発明のベニバナ種子である。

【００８２】

35

さらなる実施形態において、１つ以上の子孫植物またはその種子は、
ｉ）第１の外因性ポリヌクレオチド、および／または
ｉｉ）第２の外因性ポリヌクレオチド、および／または
ｉｉｉ）第３の外因性ポリヌクレオチド、
好ましくは、３つすべての外因性ポリヌクレオチドを含む。

【００８３】
さらなる実施形態において、１つ以上の子孫植物またはその種子は、上に定義される１つ以上の突然変異体を含む。

【００８４】
なおさらなる態様において、本発明は、油糧種子植物を得る方法を提供し、本方法は、
ｉ）本発明の第１のポリヌクレオチドまたは本発明の第１のベクターを含む第１の親の油糧種子植物を、本発明の第２のポリヌクレオチドまたは本発明の第１のベクターを含む第２の親の油糧種子植物と交配させることと、
ｉｉ）交配からの子孫植物を両方のポリヌクレオチドまたは両方のベクターの存在についてスクリーニングすることと、
ｉｉｉ）（ａ）第１のポリヌクレオチドもしくは第１のベクター、および（ｂ）第２のポリヌクレオチドもしくは第２のベクターの両方を含み、植物の種子の油含有物中のオレイン酸の比率の増加、およびパルミチン酸の比率の減少をさらに有する、子孫植物を選択することと、
を含む。

【００８５】
さらなる態様において、本発明は、ベニバナ植物の遺伝子型を決定する方法であって、本方法は、植物の核酸分子を検出することを含み、この核酸分子は、ベニバナ植物のＣｔＦＡＤ２－１、ＣｔＦＡＤ２－２、もしくはＣｔＦＡＤ２－１０遺伝子のうちの１つ以上、好ましくは、ＣｔＦＡＤ２－１およびＣｔＦＡＤ２－２遺伝子のうちの少なくとも１つもしくはその両方、または少なくともＣｔＦＡＤ２－１遺伝子に連結される、および／または少なくともその一部を含む。

【００８６】
一実施形態において、本方法は、植物のＣｔＦＡＤ２－１、ＣｔＦＡＤ２－２、またはＣｔＦＡＤ２－１０遺伝子のうちの１つ以上の発現のレベル、および／またはその配列を決定することを含む。

【００８７】
一実施形態において、本方法は、
ｉ）第２の核酸分子を、植物の当該核酸分子にハイブリダイズすることと、
ｉｉ）少なくとも１つの他の核酸分子を、植物の当該核酸分子に任意にハイブリダイズすることと、
ｉｉｉ）当該ハイブリダイズするステップ（複数を含む）の生成物、または当該ハイブリダイズするステップ（複数を含む）からの生成物の不在を検出することと、を含む。

36

【００８８】
なおさらなる実施形態において、第２の核酸分子は、植物の核酸分子の少なくとも一部を逆転写または複製するためのプライマーとして使用される。

【００８９】
核酸は、制限断片長多型分析、増幅断片長多型分析、マイクロサテライト増幅、核酸配列決定、および／または核酸増幅等が含まれるが、これらに限定されない様々なよく知られている手法を使用して検出することができる。

【００９０】
一実施形態において、本方法は、ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子の対立遺伝子、好ましくはｏｌ対立遺伝子の存在または不在を検出する。

【００９１】
さらなる態様において、本発明は、ベニバナ植物集団からベニバナ植物を選択する方法を提供し、本方法は、
ｉ）本発明の方法を使用して、当該植物集団の遺伝子型を決定することであって、当該植物集団が２つの植物間の交配から得られ、このうちの少なくとも１つの植物が、ＣｔＦＡＤ２－１、ＣｔＦＡＤ２－２、もしくはＣｔＦＡＤ２－１０遺伝子、好ましくはＣｔＦＡＤ２－１およびＣｔＦＡＤ２－２遺伝子のうちの少なくとも１つもしくはその両方、または少なくともＣｔＦＡＤ２－１遺伝子の対立遺伝子を含み、当該植物の種子の発育中、当該対立遺伝子を欠失しているベニバナ植物の対応する種子と比較して、Δ１２デサチュラーゼ活性レベルの低下をもたらす、当該植物集団の遺伝子型を決定することと、
ｉｉ）当該対立遺伝子の存在または不在に基づいてベニバナ植物を選択することと、を含む。

【００９２】
さらなる態様において、本発明は、ＣｔＦＡＤ２－１、ＣｔＦＡＤ２－２、またはＣｔＦＡＤ２－１０遺伝子の対立遺伝子を、その対立遺伝子を欠失しているベニバナ植物に導入する方法を提供し、本方法は、
ｉ）第１の親のベニバナ植物を第２の親のベニバナ植物と交配させることであって、前記第２の植物は、ＣｔＦＡＤ２－１、ＣｔＦＡＤ２－２、またはＣｔＦＡＤ２－１０遺伝子の当該対立遺伝子を含む、交配させることと、
ｉｉ）ステップｉ）の交配の子孫を、第１の親の植物と同じ遺伝子型の植物と、第１の親の遺伝子型の大部分を有するが、当該対立遺伝子を含む植物を生成するために十分な回数戻し交配することと、を含み、
その対立遺伝子が、当該植物の種子の発育中、当該対立遺伝子を欠失しているベニバナ植物の対応する種子と比較して、Δ１２デサチュラーゼ活性レベルの低下をもた

らし、子孫植物は、本発明の方法を使用して、当該対立遺伝子の存在または不在について遺伝子型が決定される。

【００９３】

また、本発明の方法を使用して生成される、トランスジェニック植物、またはその子孫植物、またはその種子が提供される。

【００９４】

さらなる態様において、本発明は、種子を生成する方法を提供し、本方法は、

ａ）本発明の植物を、好ましくは少なくとも１０００のそのような植物集団の一部として領域内で生育させることと、

ｂ）種子を収穫することと、を含む。

【００９５】

なおさらなる態様において、本発明は、本発明の油糧種子またはベニバナ種子から、本発明の植物もしくはその一部から、本発明の細胞から、および／または本発明の非ヒトトランスジェニック生物もしくはその一部から、本発明のプロセスのうちの１つ以上によって得られる、または得ることが可能な油を提供する。

【００９６】

別の態様において、本発明は、本発明の脂質、本発明の油糧種子またはベニバナ種子、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、または本発明の油のうちの１つ以上、および１つ以上の許容される担体を含む組成物を提供する。

【００９７】

また、工業生成物の製造のための、本発明の脂質、本発明の組成物、本発明のプロセス、本発明の油糧種子またはベニバナ種子、本発明の植物もしくはその一部、本発明の宿主細胞、本発明の非ヒトトランスジェニック生物もしくはその一部、または本発明の油、のうちの１つ以上の使用が提供される。

【００９８】

別の態様において、本発明は、工業生成物を生成するためのプロセスを提供し、本プロセスは、

ｉ）本発明の脂質、本発明の組成物、本発明の油糧種子またはベニバナ種子、本発明の植物もしくはその一部、本発明の宿主細胞、本発明の非ヒトトランスジェニック生物もしくはその一部、または本発明の油、のうちの１つ以上を得るステップと、

ｉｉ）ステップｉ）の、本発明の脂質、本発明の組成物、本発明の油糧種子またはベニバナ種子、本発明の植物もしくはその一部、本発明の宿主細胞、本発明の非ヒトトランスジェニック生物もしくはその一部、または本発明の油、のうちの１つ以上を任意に物理的に処理するステップと、

ｉｉ）本発明の脂質、または本発明の組成物のうちの１つ以上の脂質、本発明の油糧種子またはベニバナ種子、

本発明の植物もしくはその一部、本発明の宿主細胞、本発明の非ヒトトランスジェニック生物もしくはその一部、または本発明の油、またはステップｉｉ）の物理的に処理された生成物の少なくとも一部を、熱、化学、もしくは酵素的方法、またはそれらの任意の組み合わせを脂質に適用することによって、工業生成物に変換するステップと、

ｉｉｉ）工業生成物を回収し、

それによって、工業生成物を生成することと、を含む。

【００９９】

なおさらなる態様において、本発明は、燃料を生成する方法を提供し、本方法は、

ｉ）本発明の脂質、本発明の１つ以上の脂質、本発明の油糧種子もしくはベニバナ種子、本発明の植物もしくはその一部、本発明の宿主細胞、本発明の非ヒトトランスジェニック生物もしくはその一部、または本発明の油、のうちの１つ以上を、アルコールと任意に触媒の存在下で反応させて、アルキルエステルを生成することと、

ｉｉ）任意に、アルキルエステルを石油燃料と混合することと、を含む。

【０１００】

一実施形態において、アルキルエステルは、メチルエステルである。

【０１０１】

さらなる態様において、本発明は、飼料を生成する方法を提供し、本方法は、本発明の脂質、本発明の組成物、本発明の油糧種子もしくはベニバナ種子、本発明の植物もしくはその一部、本発明に記載の宿主細胞、本発明の非ヒトトランスジェニック生物もしくはその一部、または本発明の油、のうちの１つ以上を、少なくとも１つの他の植物成分と混合することを含む。

【０１０２】

また、本発明の脂質、本発明の組成物、本発明の油糧種子もしくはベニバナ種子、本発明の植物もしくはその一部、本発明に記載の宿主細胞、本発明の非ヒトトランスジェニック生物もしくはその一部、または本発明の油、のうちの１つ以上を含む、飼料、化粧品、または化学物質も提供される。

【０１０３】

なおさらなる態様において、本発明の脂質、本発明の組成物のうちの１つ以上の脂質、本発明のプロセス、本発明の油糧種子もしくはベニバナ種子、本発明の植物もしくはその一部、本発明の宿主細胞、本発明の非ヒトトランスジェニック生物もしくはその一部、または本発明の油、のうちの１つ以上から生成されるか、またはそれらを使用する製品が提供される。

【０１０４】

本明細書の任意の実施形態は、特に具体的に明記しない限り、任意の他の実施形態に変更すべきところは変更して適用すると解釈されるものとする。

39

【０１０５】
本発明は、本明細書に記載される特定の実施形態によって範囲を限定されるものではなく、例示のみを目的とするものである。本明細書に記載されるような、機能的に同等の製品、組成物、および方法は、明らかに、本発明の範囲内である。
【０１０６】
本明細書全体を通じて、特に具体的に明記しない限り、または特に文脈がそれ以外を必要としない限り、単一のステップ、組成物、ステップ群または組成物群への言及は、１つおよび複数（すなわち、１つ以上）のそのようなステップ、組成物、ステップの群または組成物の群を包含すると解釈されるものとする。
【０１０７】
以下の非制限的実施例により、および添付の図面を参照して、本発明を以下で説明する。
【図面の簡単な説明】
【０１０８】
【図１】ベニバナＦＡＤ２様遺伝子ファミリーおよび他の植物から分岐したＦＡＤ２様酵素によってコードされたアミノ酸配列の系統発生的比較。示される系統樹は、ベクターＮＴＩ（ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）の使用によって作成された。ＦＡＤ２デサチュラーゼ（ＤＥＳ）、ヒドロキシラーゼ（ＯＨ）、エポキシゲナーゼ（ＥＰＯＸ）、アセチレナーゼ（ＡＣＥＴ）、およびコンジュガーゼ（ＣＯＮＪ）が、アラインメントに含まれた。系統樹に示されたアミノ酸配列のＧｅｎｅＢａｎｋアクセッション番号は、ｃｏＣＯＮＪ，ＡＡＫ２６６３２．１、ｃａＡＣＥＴ，ＡＢＣ００７６９．１、ｃｐＥＰＯＸ，ＣＡＡ７６１５６．１、ｈａＡＣＥＴ，ＡＢＣ５９６８４．１、ｄｓＡＣＥＴ，ＡＡＯ３８０３６．１、ｄｃＡＣＥＴ，ＡＡＯ３８０３３．１、ｈｈＡＣＥＴ，ＡＡＯ３８０３１．１、ｈａＤＥＳ－２，ＡＡＬ６８９８２．１、ｈａＤＥＳ－３，ＡＡＬ６８９８３．１、ｌｕＤＥＳ，ＡＣＦ４９５０７、ｈａＤＥＳ－１，ＡＡＬ６８９８２．１、ｎｔＤＥＳ，ＡＡＴ７２２９６．２、ｏｅＤＥＳ，ＡＡＷ６３０４０、ｓｉＤＥＳ，ＡＡＦ８０５６０．１、ｇｈＤＥＳ－１，ＣＡＡ６５７４４．１、ｒｃＯＨ，ＡＡＣ４９０１０．１、ａｔＤＥＳ，ＡＡＭ６１１１３．１、ｐｆＯＨ：ＤＥＳ，ＡＡＣ３２７５５．１、ｐｌＯＨ，ＡＢＱ０１４５８．１、ｇｈＤＥＳ－４，ＡＡＱ１６６５３．１、ｇｈＤＥＳ－２，ＣＡＡ７１１９９．１．（ｃｏ，Ｃａｌｅｎｄｕｌａ ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ、ｃａ，Ｃｒｅｐｉｓ ａｌｐｉｎｅ、ｃｐ，Ｃｒｅｐｉｓ ｐａｌａｅｓｔｉｎａ、ｈａ，Ｈｅｌｉａｎｔｈｕｓ ａｎｎｕｕｓ、ｄｓ，Ｄｉｍｏｒｐｈｏｔｈｅｃａ ｓｉｎｕａｔｅ、ｄｃ，Ｄａｕｃｕｓ ｃａｒｏｔａ、ｈｈ，Ｈｅｄｅｒａ ｈｅｌｉｘ、ｌｕ，Ｌｉｎｕｍ ｕｓｉｔａｔｉｓｓｉｍｕｍ、ｎｔ，Ｎｉｃｏｔｉａｎａ ｔａｂａｃｕｍ、ｏｅ，Ｏｌｅａ ｅ

40

ｕｒｏｐａｅａ、ｓｉ，Ｓｅｓａｍｕｍ ｉｎｄｉｃｕｍ、ｒｃ，Ｒｉｃｉｎｕｓ ｃｏｍｍｕｎｉｓ、ａｔ，Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ ｔｈａｌｉａｎａ、ｐｆ，Ｐｈｙｓａｒｉａ ｆｅｎｄｌｅｒｉ、ｐｌ，Ｐｈｙｓａｒｉａ ｌｉｎｄｈｅｉｍｅｒｉ）である。
【図２】ベニバナ遺伝子型ＳＵにおけるＣｔＦＡＤ２様ゲノム構造のサザンブロットハイブリダイゼーション分析。ゲノムＤＮＡは、アガロースゲル上での分離前に、８つの異なる制限酵素を用いて消化させた。これらの酵素は、ＡｃｃＩ（レーン１）、ＢｇｌＩＩ（２）、ＢａｍＨＩ（３）、ＥｃｏＲＩ（４）、ＥｃｏＲＶ（５）、ＨｉｎｄＩＩＩ（６）、ＸｂａＩ（７）、およびＸｈｏＩ（８）であった。このブロットは、ＣｔＦＡＤ２－６の放射標識された全コード領域でプローブされ、低ストリンジェントな条件で洗浄された。
【図３】ＣｔＦＡＤ２－１（Ｂ）、ＣｔＦＡＤ２－２（Ｃ）、ＣｔＦＡＤ２－９（Ｄ）、ＣｔＦＡＤ２－１０（Ｅ）、およびＣｔＦＡＤ２－１１（Ｆ）を発現する酵母菌由来の脂肪酸組成のＧＣ－ＭＳ脂肪酸分析。空のベクター（Ａ）、およびＣ１８：２異性体（Ｇ）の混合物のＧＣ痕跡。
【図４】Ｎ．ベンタミアーナ葉において一過的に発現したＣｔＦＡＤ２－１１後の脂肪酸組成のＧＣ－ＭＳ脂肪酸分析。
【図５】ベニバナＣｔＦＡＤ２遺伝子のＲＴ－ｑＰＣＲ発現分析。
【図６】突然変異体におけるＣｔＦＡＤ２－１コード領域の中央にヌクレオチド欠失を示す、野生型ＳＵおよび３つの高オレイン酸遺伝子型、すなわち、Ｓ－３１７、ＣＷ９９－ＯＬ、およびＬｅｓａｆ４９６由来のＣｔＦＡＤ２－１対立遺伝子の領域のヌクレオチド比較。
【図７】野生型変種ＳＵおよび高オレイン酸遺伝子型Ｓ－３１７におけるＣｔＦＡＤ２－１　５’ＵＴＲイントロンのＤＮＡ配列比較。囲み内のＤＮＡ配列を使用して、高オレイン酸に特異的なおよび野生型に特異的なＰＣＲ生成物に対する完全なＰＣＲマーカーを設計した。
【図８】早期（７　ＤＰＡ）、中期（１５　ＤＰＡ）、および晩期（２０　ＤＰＡ）の３つの発育段階の発育中の胚におけるＣｔＦＡＤ２－１およびＣｔＦＡＤ２－２ｍＲＮＡレベルのリアルタイムｑ－ＰＣＲ分析。ベニバナ変種は、野生型ＳＵ、および３つの高オレイン酸変種：Ｓ－３１７、ＣＷ９９－ＯＬ、およびＬｅｓａｆ４９６を含む。
【図９】ベニバナ変種ＳＵの葉、根、および発育中の胚におけるＣｔＦａｔＢ遺伝子のリアルタイムｑＰＣＲ分析。Ｅｍ－１（早期）、Ｅｍ－２（中期）、およびＥｍ－３（晩期）。
【図１０】ベニバナＦＡＤ６配列と高等植物において特定されたＦＡＤ６色素体Δ１２デサチュラーゼとの間の系統発生関係を示す系統樹。ジャトロファクルカス（Ｊ

41

atropha curcas）（EU106889）、オレアユーロパエア（Olea europaea）（AY733075）、ポプラトリコカルパ（Populus trichocarpa）（EF147523）、アラビドプシスサリアナ（Arabidopsis thaliana）（AY079039）、デスキュリアナソフィア（Descuriana sophia）（EF524189）、グリシンマックス（AK243928）、ブラシカナプス（Brassica napus）（L29214）、ポルチュラカオレラセア（Portulaca oleracea）（EU376530）、アラキスヒポゲア（Arachis hypogaea）（FJ768730）、ギンコビロバ（Ginkgo biloba）（HQ694563）。

【図１１】単一種子のＬＣ－ＭＳ分析によるＳ３１７対Ｓ３１７＋６０３．９のジアシルグリセロール（ＤＡＧ）組成（モル％）。

【図１２】単一種子のＬＣ－ＭＳ分析によるＳ３１７対Ｓ３１７＋６０３．９のトリアシルグリセロール（ＴＡＧ）組成（モル％）。

【図１３】２０１１／２０１２年のオーストラリアの夏におけるＮａｒｒａｂｒｉでの野外条件下でのベニバナ変種のオレイン酸含量。

【図１４】（Ａ）環状側鎖の番号付けを有する塩基性植物ステロール構造。（Ｂ）一部の植物ステロールの化学構造。

【０１０９】

配列表の説明

配列番号１－ベニバナＦＡＤ２－１をコードするｃＤＮＡ。

配列番号２－ベニバナＦＡＤ２－２をコードするｃＤＮＡ。

配列番号３－ベニバナＦＡＤ２－３をコードするｃＤＮＡ。

配列番号４－ベニバナＦＡＤ２－４をコードするｃＤＮＡ。

配列番号５－ベニバナＦＡＤ２－５をコードするｃＤＮＡ。

配列番号６－ベニバナＦＡＤ２－６をコードするｃＤＮＡ。

配列番号７－ベニバナＦＡＤ２－７をコードするｃＤＮＡ。

配列番号８－ベニバナＦＡＤ２－８をコードするｃＤＮＡ。

配列番号９－ベニバナＦＡＤ２－９をコードするｃＤＮＡ。

配列番号１０－ベニバナＦＡＤ２－１０をコードするｃＤＮＡ。

配列番号１１－ベニバナＦＡＤ２－１１をコードするｃＤＮＡ。

42

配列番号１２－ベニバナＦＡＤ２－１をコードするオープンリーディングフレーム。

配列番号１３－ベニバナＦＡＤ２－２をコードするオープンリーディングフレーム。

配列番号１４－ベニバナＦＡＤ２－３をコードするオープンリーディングフレーム。

配列番号１５－ベニバナＦＡＤ２－４をコードするオープンリーディングフレーム。

配列番号１６－ベニバナＦＡＤ２－５をコードするオープンリーディングフレーム。

配列番号１７－ベニバナＦＡＤ２－６をコードするオープンリーディングフレーム。

配列番号１８－ベニバナＦＡＤ２－７をコードするオープンリーディングフレーム。

配列番号１９－ベニバナＦＡＤ２－８をコードするオープンリーディングフレーム。

配列番号２０－ベニバナＦＡＤ２－９をコードするオープンリーディングフレーム。

配列番号２１－ベニバナＦＡＤ２－１０をコードするオープンリーディングフレーム。

配列番号２２－ベニバナＦＡＤ２－１１をコードするオープンリーディングフレーム。

配列番号２３－ベニバナＦＡＤ２－１遺伝子のイントロン配列。

配列番号２４－ベニバナＦＡＤ２－２遺伝子のイントロン配列。

配列番号２５－ベニバナＦＡＤ２－１０遺伝子のイントロン配列。

配列番号２６－切断型ベニバナＦＡＤ２－１（ＨＯ突然変異体）をコードするｃＤＮＡ。

配列番号２７－ベニバナＦＡＤ２－１。

配列番号２８－ベニバナＦＡＤ２－２。

配列番号２９－ベニバナＦＡＤ２－３。

配列番号３０－ベニバナＦＡＤ２－４。

配列番号３１－ベニバナＦＡＤ２－５。

配列番号３２－ベニバナＦＡＤ２－６。

配列番号３３－ベニバナＦＡＤ２－７。

配列番号３４－ベニバナＦＡＤ２－８。

配列番号３５－ベニバナＦＡＤ２－９。

配列番号３６－ベニバナＦＡＤ２－１０。

配列番号３７－ベニバナＦＡＤ２－１１。

配列番号３８－切断型ベニバナＦＡＤ２－１（ＨＯ突然変異体）。

配列番号３９－ベニバナＦＡＴＢ－１のｃＤＮＡ。

配列番号４０－ベニバナＦＡＴＢ－２をコードするｃＤＮＡ。

配列番号４１－ベニバナＦＡＴＢ－３をコードするｃＤＮＡ。

配列番号４２－ベニバナＦＡＴＢ－２をコードするオープンリーディングフレーム。

43

配列番号４３－ベニバナＦＡＴＢ－３をコードするオープンリーディングフレーム。
配列番号４４－ベニバナＦＡＴＢ－２。
配列番号４５－ベニバナＦＡＴＢ－３。
配列番号４６－ベニバナＦＡＤ６をコードするｃＤＮＡ。
配列番号４７－ベニバナＦＡＤ６をコードするオープンリーディングフレーム。
配列番号４８－ベニバナＦＡＤ６。
配列番号４９－ＲＮＡサイレンシングの構築体に使用されるＣｔＦＡＤ２－２配列。
配列番号５０－ＲＮＡサイレンシングの構築体に使用されるＣｔＦＡＴＢ－３配列。
配列番号５１－ＲＮＡサイレンシングの構築体に使用されるＣｔＦＡＤ６配列。
配列番号５２－アラビドプシスサリアナ（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ　ｔｈａｌｉａｎａ）オレオシンプロモーター。
配列番号５３－亜麻リシンプロモーター。
配列番号５４－ノパシンターゼ（Ｎｏｓ）ポリアデニル化信号。
配列番号５５－オクトピンシンターゼ（Ｏｃｓ）ポリアデニル化信号。
配列番号５６－ｏｌ対立遺伝子の領域に対応する野生型ＣｔＦＡＤ２－１配列。
配列番号５７－フレームシフト（Ｓ－３１７、ＣＷ９９－ＯＬ、およびＬｅＳａｆ４９６と同じ）を有するＯｌ対立遺伝子のＣｔＦＡＤ２－１配列。
配列番号５８～１５８－オリゴヌクレオチドプライマー。
配列番号１５９～１６９－Ｃｔ　ＦＡＤ２酵素のモチーフ。
配列番号１７０－野生型ベニバナ変型ＳＵ　ＣｔＦＡＤ２－１　５’ＵＴＲイントロン。
配列番号１７１－高オレイン酸ベニバナ変型Ｓ－３１７　ＣｔＦＡＤ２－１　５’ＵＴＲイントロン。
【発明を実施するための形態】
【０１１０】
一般的手法および定義
特に具体的に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術および科学用語は、当業者（例えば、細胞培養、分子遺伝子学、免疫学、免疫組織化学、タンパク質化学、および生化学における）によって一般的に理解されているのと同じ意味を有すると解釈されるものとする。
【０１１１】
特に指示されない限り、本発明において用いられる組み換えタンパク質、細胞培養、および免疫学的手法は、当業者によく知られている標準的な手順である。そのような手法は、例えば、Ｊ．Ｐｅｒｂａｌ，Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ｇｕｉｄｅ　ｔｏ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　ａｎｄ　Ｓｏｎｓ（１９８４）、Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｕｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ（１９８９）、Ｔ．Ａ．Ｂｒｏｗｎ（ｅｄｉｔｏｒ），Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｖｏｌｕｍｅｓ　１　ａｎｄ　２，ＩＲＬ　Ｐｒｅｓｓ（１９９１）、Ｄ．Ｍ．Ｇｌｏｖｅｒ　ａｎｄ　Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ（ｅｄｉｔｏｒｓ），ＤＮＡ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｖｏｌｕｍｅｓ　１－４，ＩＲＬ　Ｐｒｅｓｓ（１９９５および　１９９６）、およびＦ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．（ｅｄｉｔｏｒｓ），Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ　Ｐｕｂ．Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ　ａｎｄ　Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ（１９８８、現在までのすべての最新版を含む），ＥｄＨａｒｌｏｗ　ａｎｄ　Ｄａｖｉｄ　Ｌａｎｅ（ｅｄｉｔｏｒｓ）　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｕｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，（１９８８）、およびＪ．Ｅ．Ｃｏｌｉｇａｎ　ｅｔ　ａｌ．（ｅｄｉｔｏｒｓ）　Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ（現在までのすべての最新版を含む）等の出典文献全体を通じて記述され、説明されている。
【０１１２】
「および／または」、例えば、「Ｘおよび／またはＹ」という用語は、「ＸおよびＹ」または「ＸまたはＹ」のいずれかを意味すると解釈され、両方の意味またはいずれかの意味への明示的な支持を提供すると解釈されるものとする。
【０１１３】
本明細書で使用される、約という用語は、反対の定めのない限り、指定値の＋／－１０％、より好ましくは＋／－５％、より好ましくは＋／－４％、より好ましくは＋／－３％、より好ましくは＋／－２％、より好ましくは＋／－１．５％、より好ましくは＋／－１％、なおより好ましくは＋／－０．５％を指す。
【０１１４】
本明細書全体を通じて、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」という用語、または「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」もしくは「含むこと」等の変形例は、記述される要素、完全体、もしくはステップ、または要素、完全体、もしくはステップの群の包含を示唆するが、任意の他の要素、整数、もしくはステップ、または要素、完全体、もしくはステップの群の排除を示唆しないことが理解されよう

44

45

。

【０１１５】

本明細書で使用される、「抽出された脂質」という用語は、少なくとも６０％（ｗ／ｗ）の脂質を含み、トランスジェニック生物またはその一部から、例えば、粉砕することによって抽出された脂質組成物を指す。さらに、本明細書で使用される、「抽出油」という用語は、少なくとも６０％（ｗ／ｗ）の油を含み、トランスジェニック生物またはその一部から抽出された油組成物を指す。

【０１１６】

本明細書で使用される、「精製された」という用語は、本発明の脂質または油に関連して使用される場合、一般に、その抽出された脂質または油が脂質／油の成分の純度を高める１つ以上の加工ステップに供されていることを意味する。例えば、精製ステップは、抽出油を脱ガム、脱臭、脱色、乾燥、および／または分留することからなる群のうちの１つ以上またはすべてを含み得る。しかしながら、本明細書で使用される、「精製された」という用語は、全脂肪酸含量のパーセンテージとしてオレイン酸含量を増加させるために、本発明の脂質または油の脂肪酸組成を変化させるエステル交換プロセスまたは他のプロセスを含まない。言い換えれば、精製された脂質または油の脂肪酸組成は、精製されていない脂質または油の脂肪酸組成と本質的に同じである。抽出された脂質または油の脂肪酸組成、例えば、オレイン酸、リノール酸、およびパルミチン酸含量は、それが得られる植物種子における脂質または油の脂肪酸組成と本質的に同じである。この文脈において、「本質的に同じ」は、＋／－１％、または好ましくは＋／－０．５％を意味する。

【０１１７】

本明細書で使用される「オレイン酸不飽和率」または「ＯＤＰ」という用語は、脂質の脂肪酸組成のパーセンテージとして表されるリノール酸およびα－リノレン酸の相対量を、それぞれパーセンテージとして表されるオレイン酸、リノール酸、およびα－リノレン酸の相対量の合計で割ることを含む計算を指す。式は、

ＯＤＰ＝（リノール酸（％）＋α－リノレン酸（％））／（オレイン酸（％）＋リノール酸（％）＋α－リノレン酸（％））である。

例えば、実施例１５のＴＧ６０３．１２（５）は、２．１５％の全リノール酸およびα－リノレン酸含量、９３．８８％のリノール酸、α－リノレン酸　オレイン酸含量を有し、ＯＤＰを０．０２２９とする。

【０１１８】

本明細書で使用される、「パルミチン酸－リノール酸－オレイン酸値」または「ＰＬＯ」という用語は、脂質の脂肪酸組成のパーセンテージとして表されるリノール酸およびパルミチン酸の相対量を、パーセンテージとして表されるオレイン酸の相対量で割ることを含む計算を指す。式は、

46

ＰＬＯ＝（パルミチン酸（％）＋リノール酸（％））／オレイン酸（％）である。

例えば、実施例１５のＴＧ６０３．１２（５）は、４．７１％の全リノール酸およびパルミチン酸含量ならびに９１．７３％のオレイン酸含量を有し、ＰＬＯを０．０５１３とする。

【０１１９】

本明細書で使用される、「オレイン酸一価不飽和率」または「ＯＭＰ」という用語は、脂質の脂肪酸組成のパーセンテージとして表される非オレイン酸一価不飽和脂肪酸の相対量を、パーセンテージとして表されるオレイン酸の相対量で割ることを含む計算を指す。

式は、

ＯＭＰ＝（一価不飽和脂肪酸（％）－オレイン酸（％））／オレイン酸（％）

例えば、実施例１５のＴＧ６０３．１２（５）は、１．１３％のオレイン酸（０．８４％Ｃ１８：１Δ１１＋０．２９％　Ｃ２０：１）を除いた全一価不飽和脂肪酸含量および９１．７３％のオレイン酸含量を有し、ＯＭＰを０．０１２３とする。

【０１２０】

「対応する」という用語は、本発明の細胞、または植物もしくはその一部（種子）と同じまたは同様の遺伝子背景を有するが、本明細書で記載されるように修飾されないもの（例えば、本発明の外因性ポリヌクレオチドを欠失している細胞、または植物もしくはその一部）を有さない、細胞、または植物もしくはその一部（種子等）を指す。対応する細胞、または植物もしくはその一部（種子）は、例えば、本明細書で記載されるように修飾された細胞、または植物もしくはその一部（種子）により生成されたオレイン酸の量、ＦＡＤ２活性、ＦＡＴＢ活性、またはＦＡＤ６活性、のうちの１つ以上を比較するための対照として使用することができる。当業者は、そのような比較のための適切な「対応する」細胞、植物、またはその一部（種子）を容易に決定することができる。

【０１２１】

本明細書で使用される、「種子油」という用語は、少なくとも６０％（ｗ／ｗ）の脂質を含む植物の種子から得られる、または種子油が依然として種子中に存在する場合、種子から得ることが可能である組成物を指す。つまり、本発明から成る、または本発明を使用して得られた種子油は、特に「抽出された種子油」または同様の用語と称されない限り、種子またはその一部、例えば、子葉または胚中に存在する種子油を含み、この場合、それは種子から抽出されている油である。種子油は、好ましくは、抽出された種子油である。

種子油は、典型的には、室温で液体である。好ましくは、種子油中の全脂肪酸（ＴＦＡ）含量は、７０％超のＣ１８脂肪酸、好ましくは９０％超のオレイン酸（Ｃ１８：１Δ９）である。脂肪酸は、典型的には、例えば、Ｔ

47

AG、DAG、アシル－CoA、またはリン脂質等のエステル化された形態である。特に明記しない限り、脂肪酸は、遊離脂肪酸および／またはエステル化した形態であり得る。一実施形態において、本発明の種子油中の脂肪酸の少なくとも５０%、より好ましくは少なくとも７０%、より好ましくは少なくとも８０%、より好ましくは少なくとも９０%、より好ましくは少なくとも９１%、より好ましくは少なくとも９２%、より好ましくは少なくとも９３%、より好ましくは少なくとも９４%、より好ましくは少なくとも９５%、より好ましくは少なくとも９６%、より好ましくは少なくとも９７%、より好ましくは少なくとも９８%、より好ましくは少なくとも９９%は、TAGとして見出され得る。一実施形態において、本発明の種子油は、種子または粗抽出物中でそれが結合している１つ以上の他の脂質、核酸、ポリペプチド、または他の汚染分子から分離された、「実質的に精製された」または「精製された」油である。

実質的に精製された種子油は、種子または抽出物中でそれに伴う他の成分を少なくとも６０%含まない、より好ましくは少なくとも７５%含まない、より好ましくは少なくとも９０%含まないことが好ましい。本発明の種子油は、ステロール等であるが、これに限定されない、非脂肪酸分子をさらに含み得る（実施例１７を参照されたい）。一実施形態において、種子油は、ベニバナ油（カルタムスチンクトリウス（Carthamus tinctorius））、ヒマワリ油（ヘリアンサスアナス（Helianthus annus））、綿実油（ゴシッピウムヒルスツム（Gossypium hirsutum））、ヒマシ油（リシヌスコミュニス（Ricinus communis））、ナタネ油（ブラシカナプス（Brassica napus）、ブラシカラパ（Brassicarapa）亜種）、カラシ油（ブラシカユンセア（Brassica juncea））、他のブラシカ（Brassica）油（例えば、ブラシカナポブラシカ（Brassica napobrassica）、ブラシカカメリナ（Brassica camelina））、アマニ油（リナムウシタテイシマム（Linum usitatissimum））、大豆油（グリシンマックス（Glycine max））、コーン油（ゼアマイス（Zea mays））、タバコ油（ニコチアナタバカム（Nicotiana tabacum））、ピーナッツ油（アラキスヒポゲア（Arachis hypogaea））、ヤシ油（エラエイスギネエンシス（Elaeis guineensis））、ココナッツ油（ココスヌシフェラ（Cocos nucifera））、アボカド油（ペルセアアメリカナ（Persea americana））、オリーブ油（オレアユーロパエア（Olea europaea））、カシュー油（アナカルデイウムオクシデンタレ（Anacardium occidentale）

48

）、マカデミア油（マカダミアインテルグリフォリア（Macadamia intergrifolia））、アーモンド油（プルヌスアミグダルス（Prunus amygdalus））、オート麦種子油（アベナサティバ（Avena sativa））、米油（オリザサティバ（Oryza sativa）もしくはオリザグラベリマ（Oryza glaberrima））、カメリナ油（カメリナサティバ（Camelina sativa））、ハマナ油（クラムベアビッシニカ（Crambe abyssinica））、またはアラビドプシス（Arabidopsis）種子油（アラビドプシスサリアナ（Arabidopsisthaliana））である。種子油は、当技術分野で知られている任意の方法によって種子から抽出され得る。これは、概して、種子の最初の粉砕または圧延に関連して、典型的には、非極性溶媒、例えば、ヘキサン、ジエチルエーテル、石油エーテル、クロロホルム／メタノールまたはブタノール混合物による抽出を含む。穀物中のデンプンに伴う脂質は、水－飽和ブタノールにより抽出され得る。種子油は、多糖および／またはリン脂質を除去するために当技術分野で知られている方法によって「脱ガム化」され得るか、あるいは、汚染物質を除去するか、または純度、安定性、もしくは色を改善するために他の方法で処理され得る。種子油中のTAGおよび他のエステルは、遊離脂肪酸を放出するために、例えば、酸もしくはアルカリ処理によって、またはリパーゼ作用によって加水分解され得るか、あるいは、種子油は、水素化され得るか、または当技術分野で知られているように、化学的または酵素的に処理され得る。しかしながら、一旦種子油が処理されると、もはやTAGを含まず、本明細書に称されるような種子油とはもはや見なされない。

【０１２２】

精製されたおよび／または抽出された脂質または油中の遊離およびエステル化されたステロール（例えば、シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、Δ５－アベナステロール、シトスタノール、カンペスタノール、およびコレステロール）濃度は、Phillips et al.（２００２）に記載される、および／または実施例１７に提供されるようであり得る。植物油中のステロールは、遊離アルコール、脂肪酸エステル（エステル化されたステロール）、ステロールのグリコシドおよびアシル化されたグリコシドとして存在する。天然の植物油（種子油）中のステロール濃度は、最大約１１００mg／１００gの範囲に及ぶ。水素化ヤシ油は、約６０mg／１００gで天然の植物油の最低濃度のうちの１つを有する。本発明の回収されたまたは抽出された種子油は、好ましくは約１００～約１０００mgの全ステロール／１００g（油）を有する。食物または食餌用として、ステロールは、主に、グリコシル化形態よりもむしろ、遊離またはエステル化

形態として存在する。本発明の種子油において、好ましくは、油中のステロールの少なくとも５０%は、エステル化されたステロールの約２５%を有する大豆種子油を除き、エステル化されたステロールとして存在する。本発明のベニバナ種子油は、好ましくは、約１５０～約４００ｍｇの全ステロール／１００ｇ、典型的には、約３００ｍｇの全ステロール／１００ｇの種子油を有し、主なステロールにシトステロールを有する。本発明のナタネ種子油および菜種油は、好ましくは、約５００～約８００ｍｇの全ステロール／１００ｇを有し、主なステロールにシトステロール、次に最も豊富なカンペステロールを有する。本発明のコーン種子油は、好ましくは、約６００～約８００ｍｇの全ステロール／１００ｇを有し、主なステロールにシトステロールを有する。本発明の大豆種子油は、好ましくは、約１５０～約３５０ｍｇの全ステロール／１００ｇを有し、主なステロールにシトステロール、次に最も豊富なスチグマステロールを有し、エステル化されたステロールよりもさらに遊離ステロールを有する。本発明の綿実油は、好ましくは、約２００～約３５０ｍｇの全ステロール／１００ｇを有し、主なステロールにシトステロールを有する。本発明のココナッツ油およびヤシ油は、好ましくは、約５０～約１００ｍｇの全ステロール／１００ｇを有し、主なステロールにシトステロールを有する。

本発明のピーナッツ種子油は、好ましくは、約１００～約２００ｍｇの全ステロール／１００ｇを有し、主なステロールにシトステロールを有する。本発明のゴマ種子油は、好ましくは、約４００～約６００ｍｇの全ステロール／１００ｇを有し、主なステロールにシトステロールを有する。本発明のヒマワリ種子油は、好ましくは、約２００～約４００ｍｇの全ステロール／１００ｇを有し、主なステロールにシトステロールを有する。

【０１２３】

本明細書で使用される、「脂肪酸」という用語は、飽和または不飽和のいずれかの、長さが少なくとも８個の炭素原子から成る長い脂肪族末端を有するカルボン酸を指す。典型的には、脂肪酸は、長さが少なくとも１２個の炭素から成る炭素－炭素で結合した鎖を有する。ほとんどの天然の脂肪酸は、それらの生合成が２個の炭素原子を有する酢酸塩を含むため、偶数の炭素原子数を有する。脂肪酸は、遊離状態（非エステル化）またはエステル化形態、例えば、ＴＡＧ、ＤＡＧ、ＭＡＧ、アシル－ＣｏＡ（チオエステル）結合の一部、または他の共有結合形態であり得る。エステル化形態で共有結合される場合、脂肪酸は、本明細書では、「アシル」基と称される。脂肪酸は、例えば、ホスファチジルコリン（ＰＣ）、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルリノシトール、またはジホスファチジルグリセロール等のリン脂質としてエステル化され得る。飽和脂肪酸は、鎖に沿っていかなる二重結合も他の官能基も含有しない。「飽和」という用語は、（カルボン酸［－ＣＯＯＨ］基とは別の）すべての炭素ができるだけ多くの水素を含有するという点において水素を指す。つまり、オメガ（ω）末端は、３個の水素（ＣＨ３－）を含有し、鎖の中の各炭素は２個の水素（－ＣＨ２－）を含有する。不飽和脂肪酸は、１つ以上のアルケン官能基が鎖に沿って存在し、各アルケンが鎖の単結合「－ＣＨ２－ＣＨ２－」部分を二重結合「－ＣＨ＝ＣＨ－」部分（すなわち、他の炭素に二重結合した炭素）で置換することを除いて飽和脂肪酸と類似の形態である。二重結合のいずれかの側に結合する鎖中の２個の隣の炭素原子は、シス型またはトランス型立体配置において出現し得る。

【０１２４】

本明細書で使用される、「多価不飽和脂肪酸」または「ＰＵＦＡ」という用語は、その炭素鎖中において少なくとも１２個の炭素原子と少なくとも２個のアルケン基（炭素－炭素二重結合）とを含む脂肪酸を指す。

【０１２５】

本明細書で使用される、「一価不飽和脂肪酸」という用語は、オレイン酸（Ｃ１８：１Δ９）、Ｃ１８：１Ｄ１１、およびＣ２０：１等のそれらのアシル鎖中において単一の二重結合を有する脂肪酸を指す。

【０１２６】

「トリアシルグリセリド」または「ＴＡＧ」は、グリセロールが３個の脂肪酸でエステル化されるグリセリドである。ＴＡＧ合成のＫｅｎｎｅｄｙ経路において、ＤＡＧは、上記のように形成され、次いで、第３のアシル基が、ＤＧＡＴの活性によってグリセロール骨格にエステル化される。ＴＡＧの形成のための代替経路は、酵素ＰＤＡＴおよびMＧＡＴ経路（ＰＣＴ／ＡＵ２０１１／０００７９４）によって触媒されるものを含む。

【０１２７】

「ジアシルグリセリド」または「ＤＡＧ」は、グリセロールが２個の脂肪酸でエステル化されるグリセリドである。本明細書で使用される、ＤＡＧは、ｓｎ－１，３またはｓｎ－１，２／２，３位にヒドロキシル基を含み、したがって、ＤＡＧは、ＰＡまたはＰＣ等のリン酸化分子を含まない。したがって、ＤＡＧは、細胞中の中性脂質の成分である。ＤＡＧ合成のＫｅｎｎｅｄｙ経路において、前駆体ｓｎ－グリセロール－３－リン酸塩（Ｇ－３－Ｐ）は、それぞれが脂肪酸コエンザイムＡエステルに由来する２個のアシル基にエステル化され、第１の反応において、ｓｎ－１位でグリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＡＴ）によって触媒され、ＬｙｓｏＰＡを形成し、続いて、ｓｎ－２位でリゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ（ＬＰＡＡＴ）によって触媒される第２のアシル化によって、ホスファチジン酸（ＰＡ）を形成する。次いで、この中間体は脱リン酸化されて、ＤＡＧを形成する。代替の同化経路

51

において、ＤＡＧは、ＭＧＡＴによって触媒されて、ｓｎ－１　ＭＡＧ、または好ましくはｓｎ－２　ＭＡＧのいずれかのアシル化によって形成され得る。ＤＡＧはまた、リパーゼによるアシル基の除去によってＴＡＧから形成され得るか、または本質的に、酵素ＣＰＴ、ＰＤＣＴ、もしくはＰＬＣのいずれかによるコリン頭部基の除去によってＰＣから形成され得る。

【０１２８】

本明細書で使用される「デサチュラーゼ」という用語は、典型的には、例えば、脂肪酸ＣｏＡエステル等のエステル化形態である脂肪酸基質のアシル基に炭素－炭素二重結合を導入することができる酵素を指す。アシル基は、ホスファチジルコリン（ＰＣ）等のリン脂質に、またはアシル担体タンパク質（ＡＣＰ）に、ＣｏＡに、または好ましい実施形態において、ＰＣにエステル化され得る。したがって、デサチュラーゼは、概して、３つの群に分類され得る。一実施形態において、デサチュラーゼは、フロントエンドデサチュラーゼである。

【０１２９】

本明細書で使用される「Δ１２デサチュラーゼ」および「ＦＡＤ２」という用語は、オレイン酸（１８：$1^{\Delta 9}$）をリノール酸（Ｃ１８：$2^{\Delta 9,12}$）に変換するデサチュラーゼ反応を行う膜結合Δ１２脂肪酸デスチュラーゼ（ｄｅｓｔｕｒａｓｅ）を指す。したがって、「Δ１２デサチュラーゼ活性」という用語は、オレイン酸のリノール酸への変換を指す。これらの脂肪酸は、例えば、リン脂質の一部としてのようなエステル化形態、好ましくはＰＣの形態であり得る。一実施形態において、本明細書に定義されるＦＡＤ２酵素は、３つのヒスチジンリッチモチーフ（Ｈｉｓボックス）を含む（本発明の酵素のＨｉｓボックスの例については、表５を参照されたい）。そのようなＨｉｓリッチモチーフは、ＦＡＤ２酵素において高度に保存され、生化学的触媒作用において使用される酸化二鉄複合体の形成に関与する（Ｓｈａｎｋｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８）。

【０１３０】

本明細書で使用される「ＦＡＤ２－１」および「ＣｔＦＡＤ２－１」という用語ならびにそれらの変形は、アミノ酸配列が配列番号２７として提供されるベニバナＦＡＤ２ポリペプチド、例えば、配列番号１２として提供される配列を有するヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを指す。本明細書で使用されるＦＡＤ２－１遺伝子は、そのようなポリペプチドまたはその突然変異による対立遺伝子をコードする遺伝子である。これらの用語はまた、天然の、または人工的に誘導された、または提供された配列から生成された変異体が含まれる。一実施形態において、本発明のＦＡＤ２－１は、配列番号２７として提供される配列と少なくとも９５％同一である、より好ましくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む。ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子には、活性の低下等のデサチュラーゼ活性の改変を有するポリペプチドをコードする突然変異体による対立遺伝子、または機能性ポリペプチドをコードしない対立遺伝子（ヌル対立遺伝子）が含まれる。そのような対立遺伝子は、天然であっても、人工的な突然変異生成によって誘導されてもよい。そのような対立遺伝子の例は、本明細書に記載されるＦＡＤ２－１　ｏｌ対立遺伝子である。

52

【０１３１】

本明細書で使用される「ＦＡＤ２－２」および「ＣｔＦＡＤ２－２」という用語ならびにそれらの変形は、アミノ酸配列が配列番号２８として提供されるベニバナＦＡＤ２ポリペプチド、例えば、配列番号１３として提供される配列を有するヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを指す。本明細書で使用されるＦＡＤ２－２遺伝子は、そのようなポリペプチドまたはその突然変異による対立遺伝子をコードする遺伝子である。これらの用語はまた、天然の、または人工的に誘導された、または提供された配列から生成された変異体が含まれる。一実施形態において、本発明のＦＡＤ２－２は、配列番号２８として提供される配列と少なくとも９５％同一である、より好ましくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む。ＣｔＦＡＤ２－２遺伝子には、活性の低下等の変化したデサチュラーゼ活性の改変を有するポリペプチドをコードする突然変異体による対立遺伝子、または機能性ポリペプチドをコードしない対立遺伝子（ヌル対立遺伝子）が含まれる。そのような対立遺伝子は、天然であっても、人工的な突然変異生成によって誘導されてもよい。

【０１３２】

本明細書で使用される「ＦＡＤ２－１０」および「ＣｔＦＡＤ２－１０」という用語ならびにそれらの変形は、アミノ酸配列が配列番号３６として提供されるベニバナＦＡＤ２ポリペプチド、例えば、配列番号２１として提供される配列を有するヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを指す。本明細書で使用されるＦＡＤ２－１０遺伝子は、そのようなポリペプチドまたはその突然変異による対立遺伝子をコードする遺伝子である。これらの用語はまた、天然の、または人工的に誘導された、または提供された配列から生成された変異体が含まれる。一実施形態において、本発明のＦＡＤ２－１０は、配列番号３６として提供される配列と少なくとも９５％同一である、より好ましくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む。ＣｔＦＡＤ２－１０遺伝子には、活性の低下等のデサチュラーゼ活性の改変を有するポリペプチドをコードする突然変異体による対立遺伝子、または機能性ポリペプチドをコードしない対立遺伝子（ヌル対立遺伝子）が含まれる。

そのような対立遺伝子は、天然であっても、人工的な突然変異生成によって誘導されてもよい。

【０１３３】

53

本明細書で使用される「パルミトイル－ＡＣＰチオエステラーゼ」および「ＦＡＴＢ」という用語は、パルミトイル－ＡＣＰを加水分解して、遊離パルミチン酸を生成するタンパク質を指す。したがって、「パルミトイル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性」という用語は、遊離パルミチン酸を生成するためのパルミトイル－ＡＣＰの加水分解を指す。

【０１３４】

本明細書で使用される「ＦＡＴＢ－３」および「ＣｔＦＡＴＢ－３」という用語ならびにそれらの変形は、アミノ酸配列が配列番号４５として提供されるベニバナＦＡＴＢポリペプチド、例えば、配列番号４３として提供される配列を有するヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを指す。本明細書で使用されるＦＡＴＢ－３遺伝子は、そのようなポリペプチドまたはその突然変異による対立遺伝子をコードする遺伝子である。これらの用語はまた、天然の、または人工的に誘導された、または提供された配列から生成された変異体が含まれる。一実施形態において、本発明のＦＡＴＢ－３は、配列番号４５として提供される配列と少なくとも９５％同一である、より好ましくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む。ＣｔＦＡＴＢ－３遺伝子には、活性の低下等のパルミトイル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性の改変を有するポリペプチドをコードする突然変異体による対立遺伝子、または機能性ポリペプチドをコードしない対立遺伝子（ヌル対立遺伝子）が含まれる。そのような対立遺伝子は、天然であっても、人工的な突然変異生成によって誘導されてもよい。

【０１３５】

本明細書で使用される「色素体ω６脂肪酸デサチュラーゼ」、その変形、および「ＦＡＤ６」は、それぞれ、ホスファチジルグリセロール、モノガラクトシルジアシルグリセロール、ジガラクトシルジアシルグリセロール、およびスルホキノボシル（ｓｕｌｆｏｇｕｉｎｏｖｏｓｙｌ）ジアシルグリセロールを含むすべての１６：１または１８：１を含む葉緑体膜脂質において、１６：１および１８：１の脂肪酸を１６：２および１８：２に脱飽和にする葉緑体酵素を指す。

【０１３６】

本明細書で使用される「ＦＡＤ６」および「ＣｔＦＡＤ６」という用語ならびにそれらの変形は、アミノ酸配列が配列番号４８として提供されるベニバナＦＡＤ６ポリペプチド、例えば、配列番号４７として提供される配列を有するヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを指す。本明細書で使用されるＦＡＤ６遺伝子は、そのようなポリペプチドまたはその突然変異による対立遺伝子をコードする遺伝子である。これらの用語はまた、天然の、または人工的に誘導された、または提供された配列から生成された変異体が含まれる。一実施形態において、本発明のＦＡＤ６は、配列番号４８として提供される配列と少なくとも９５％同一である、より好ましくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む。ＣｔＦＡＤ６遺伝子には、活性の低下等のデサチュラーゼ活性の改変を有するポリペプチドをコードする突然変異体による対立遺伝子、または機能性ポリペプチドをコードしない対立遺伝子（ヌル対立遺伝子）が含まれる。そのような対立遺伝子は、天然であっても、人工的な突然変異生成によって誘導されてもよい。

【０１３７】

本明細書で使用される「アセチレナーゼ」または「脂肪酸アセチレナーゼ」という用語は、三重結合を脂肪酸に導入して、アセチレン型脂肪酸の生成をもたらす酵素を指す。

【０１３８】

「Ｃｔ」という用語は、本明細書では、酵素／遺伝子がベニバナ由来であることを示すために、ＦＡＤ２、ＦＡＴＢ、およびＦＡＤ６等の用語の前に使用される。

【０１３９】

本明細書で使用される「の発現を減少させることができるサイレンシングＲＮＡ」という用語およびその変形は、内因性酵素、例えば、Δ１２デサチュラーゼ、パルミトイル－ＡＣＰチオエステラーゼ、色素体ω６脂肪酸デサチュラーゼ、またはこれらのうちの２つ以上または３つすべての組み合わせの、生成および／または活性（例えば、ｓｉＲＮＡ、ｈｐＲＮＡｉをコードする）を減少させる（下方制御する）、またはそれ自体、生成および／または活性（例えば、細胞に直接送達され得る、例えばｓｉＲＮＡである）を下方調節する、ＲＮＡ分子をコードするポリヌクレオチドを指す。一実施形態において、サイレンシングＲＮＡは、細胞中において導入遺伝子から生成され、例えば、内因性酵素をコードするｍＲＮＡの量を軽減させる、またはその翻訳を減少させることによって、細胞中において生成される内因性酵素の量を転写段階でおよび／または転写後に軽減する外因性ＲＮＡである。サイレンシングＲＮＡは、典型的には、内因性ｍＲＮＡに対して相補性であり、細胞中においてＲＩＳＣとして知られているサイレンシング複合体と関連し得る２１～２４ヌクレオチドの長さのＲＮＡである。

【０１４０】

本明細書で使用される「の活性を軽減させる突然変異体（複数を含む）」という用語は、表現型的に通常の種子（例えば、配列番号２７、２８、および３６として提供されるアミノ酸配列を含むＦＡＤ２酵素を生成する種子）と比較する場合、より低いレベルの定義された酵素活性（例えば、種子中におけるＦＡＤ２酵素活性）を有する、天然の、または人工の突然変異体（例えば、化学的な突然変異生成または部位特異的な突然変異生成によって生成される）を指す。表現型的に通常のベニバナ亜種の例には、Ｃｅｎｔｅｎｎｉａｌ、Ｆｉｎｃｈ、Ｎｕｔｒａｓａｆｆ、およびＣａｒｄｉｎａｌが含まれるが、

55

これらに限定されない。インドからのベニバナ導入において見出されたベニバナにおける最初に特定された高オレイン酸の特徴は、単一遺伝子座ＯＬでｏｌと表記される部分的に劣性な対立遺伝子によって支配された（Ｋｎｏｗｌｅｓ　ａｎｄ　Ｈｉｌｌ，１９６４）。本明細書に記載される、ＯＬ遺伝子座は、ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子に対応する。ｏｌｏｌ遺伝子型における種子油のオレイン酸含量は、通常、温室栽培された植物において、７１～７５％であった（Ｋｎｏｗｌｅｓ，１９８９）。Ｋｎｏｗｌｅｓ（１９６８）は、ｏｌ対立遺伝子をベニバナ繁殖プログラムに組み入れ、米国では、１９６６年に最初の高オレイン酸（ＨＯ）ベニバナ変種「ＵＣ－１」を公開し、これに続いて、改善された変種「Ｏｌｅｉｃ　Ｌｅｅｄ」、ならびにＳａｆｆｏｌａ３１７（Ｓ－３１７）、Ｓ－５１７、およびＳ－５１８を含むＳａｆｆｏｌａシリーズを公開した。それらの高オレイン酸（ｏｌｏｌ）の遺伝子型は、野外の異なる温度で生育させた場合、オレイン酸レベルで比較的安定した（Ｂａｒｔｈｏｌｏｍｅｗ，１９７１）。さらに、Ｋｎｏｗｌｅｓ（１９７２）はまた、３５～５０％のオレイン酸のホモ接合条件で生成された同じ遺伝子座での異なる対立遺伝子ol_1も説明した。ｏｌｏｌ遺伝子型とは対照的に、ol_1ol_1遺伝子型は、温度に対して強い応答を示した（Ｋｎｏｗｌｅｓ，１９７２）。本明細書で決定されるような、ベニバナ種子において、ＦＡＤ２－１活性（および全部のＦＡＤ２活性）の低下をもたらすｏｌ突然変異体の対立遺伝子は、図６に示されるフレームシフト突然変異（単一ヌクレオチドの欠失による）を含む突然変異ＦＡＤ２－１遺伝子である（実施例７ならびに配列番号２６および３８も参照されたい）。

【０１４１】

本明細書で使用される「油含有物が含む種子を生成する植物を生成することができる」または「油が含有する油糧種子を生成する植物を生成することができる」という表現またはその変形は、種子から生成される植物、好ましくは油糧種子植物、より好ましくはベニバナ植物が、最適条件下、例えば、実施例において参照されるもの等の温室条件下で生育させるとき、定義された成分を用いて油を生成する能力を有することを意味する。植物からの種子を所有している場合、本明細書に記載されるもののような標準的な手順を使用して、好適な温室条件下で種子のうちの少なくとも１つから子孫植物を発育させ、子孫植物からの種子油中の油含有物および脂肪酸組成について試験することは通常通りである。したがって、当業者が理解するように、野外で生育される種子は、熱波、寒波、干ばつ、洪水、霜、害虫によるストレス等のような特別の年における望ましくない条件により、本明細書に定義された必要条件のすべてを満たさない場合があるが、この種子はより望ましい条件下で生育される場合、定義された油含有物および脂肪酸組成物を生成する子

56

孫植物を生成することができるため、そのような種子は、それでもなお、本発明によって包含される。

【０１４２】

本明細書で使用される「重量」という用語は、物質または組成物の成分を含む、組成物の重量のパーセンテージとして、物質（例えば、オレイン酸、パルミチン酸、またはＰＵＦＡ、例えば、リノール酸もしくはリノレン酸）の重量を指す。例えば、オレイン酸等の特定の脂肪酸の重量は、脂質もしくは種子油の全脂肪酸含量、または種子の重量のパーセンテージとして測定され得る。

【０１４３】

本明細書で使用される「バイオ燃料」という用語は、典型的には、自動車、トラック、または石油を動力源としたモーター等の動力機械に使用される場合、そのエネルギーは、化石燃料由来よりもむしろ生物学的炭素固定由来である、あらゆる種類の燃料を指す。バイオ燃料には、バイオマス変換由来の燃料、ならびに固体バイオマス、液体燃料、およびバイオガスが含まれる。バイオ燃料の例には、バイオアルコール、バイオディーゼル、合成ディーゼル、植物油、バイオエーテル、バイオガス、合成ガス、固体バイオ燃料、藻類由来の燃料、バイオ水素、バイオメタノール、２，５－ジメチルフラン（ＤＭＦ）、バイオジメチルエーテル（ｂｉｏＤＭＥ）、Ｆｉｓｃｈｅｒ－Ｔｒｏｐｓｃｈディーゼル、バイオ水素ディーゼル、混合アルコール、および木材ディーゼルが含まれる。

【０１４４】

本明細書で使用される「工業生成物」という用語は、例えば、脂肪酸メチル－および／もしくはエチル－エステル、またはアルカン、例えばメタン、通常大気温度で液体である長鎖アルカンの混合物、バイオ燃料、一酸化炭素および／もしくは水素、またはバイオアルコール、例えば、エタノール、プロパノール、もしくはブタノール等、またはバイオ炭のような、主に炭素および水素から作製される炭化水素生成物を指す。「工業生成物」という用語は、他の工業生成物に変換することができる中間の生成物を含むことを目的とし、例えば、合成ガスはそれ自体、炭化水素生成物（これもまた、工業生成物であると見なされる）を合成するために使用することができる工業生成物であると見なされる。本明細書で使用される工業生成物という用語には、上記の化合物の純粋な形態、またはより一般的には、様々な化合物および成分の混合物の両方が含まれ、当技術分野で理解されているように、例えば、炭化水素生成物は、様々な範囲の炭素鎖長を含み得る。

【０１４５】

ポリヌクレオチド

「ポリヌクレオチド」および「核酸」という用語は、互換可能に使用される。それらは、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのいずれかの、任意の長さ

57

のヌクレオチドのポリマー形態を指す。本発明のポリヌクレオチドは、その起源または操作によって、（１）天然に関連しているポリヌクレオチドのすべてもしくは一部分に関連していないか、（２）天然に連結するもの以外のポリヌクレオチドに連結するか、または（３）天然に生じない、ゲノム、ｃＤＮＡ、半合成、または合成起源、二本鎖もしくは一本鎖から成り得る。以下は、ポリヌクレオチドの非限定例である：遺伝子もしくは遺伝子断片のコードもしくは非コード領域、連鎖解析から定義された遺伝子座（複数を含む）、エクソン、イントロン、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、トランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、リボザイム、ｃＤＮＡ、組み換えポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離ＤＮＡ、任意の配列の単離ＲＮＡ、任意の配列のキメラＤＮＡ、核酸プローブ、およびプライマー。本発明の好ましいポリヌクレオチドには、植物細胞中で転写することができる二本鎖ＤＮＡ分子、およびサイレンシングＲＮＡ分子が含まれる。

【０１４６】

本明細書で使用される「遺伝子」という用語は、その最も広い文脈で解釈されるものとし、構造遺伝子の転写領域および、翻訳される場合、タンパク質コード領域を含み、いずれの末端においても少なくとも約２ｋｂの距離にわたる５’および３’両末端上のコード領域に隣接して位置し、遺伝子の発現に関与する配列を含むデオキシリボヌクレオチド配列を含む。この点に関して、遺伝子は、所定の遺伝子と天然に関連するプロモーター、エンハンサー、終止、および／またはポリアデニル化シグナル等の制御シグナルを含むか、または異種制御シグナルを含み、その場合、遺伝子は、「キメラ遺伝子」と称される。タンパク質コード領域の５’に位置し、ｍＲＮＡ上に存在する配列は、５’非翻訳配列と称される。タンパク質コード領域の３’または下流に位置し、ｍＲＮＡ上に存在する配列は、３’非翻訳配列と称される。「遺伝子」という用語は、ｃＤＮＡ形態およびゲノム形態の両方の遺伝子を包含する。遺伝子のゲノム形態またはクローンは、「イントロン」、「介在領域」、または「介在配列」と称される非コード配列で中断され得るコード領域を含む。イントロンは、核ＲＮＡ（ｎＲＮＡ）中に転写される遺伝子のセグメントである。イントロンは、エンハンサー等の調節要素を含むことができる。イントロンは、核内または一次転写生成物から除去または「スプライス」され、したがって、イントロンは、ｍＲＮＡ転写生成物中に存在しない。ｍＲＮＡは、翻訳中、新生ポリペプチド中におけるアミノ酸の配列または順序を特定するように機能する。「遺伝子」という用語は、本明細書に記載される本発明のタンパク質のすべてまたは一部をコードする合成または融合分子および上記のいずれか１つに対して相補的なヌクレオチド配列を含む。

58

【０１４７】

「対立遺伝子」は、細胞、個々の植物、または集団内の遺伝子配列の１つの特定形態（例えば遺伝子）を指し、特定形態は、遺伝子の配列内の少なくとも１つの、多くの場合、１つを超える変異部位の配列において同じ遺伝子の他の形態とは異なる。異なる対立遺伝子間で異なるこれらの変異部位の配列は、「変異（ｖａｒｉａｎｃｅ）」、「多型」、または「突然変異」と称される。

【０１４８】

本明細書で使用される「キメラＤＮＡ」は、実際には、天然に見出されない任意のＤＮＡ分子を指し、本明細書では、「ＤＮＡ構築物」と称される。典型的には、キメラＤＮＡは、実際には一緒に見出されることのない調節および転写またはタンパク質コード配列を含む。したがって、キメラＤＮＡは、異なる源に由来する調節配列およびコード配列、または同じ源に由来するが、実際に見出されるものとは異なる方法で配置される調節配列およびコード配列を含むことができる。オープンリーディングフレームは、その天然の上流および下流調節要素に連結されても、連結されなくてもよい。オープンリーディングフレームは、例えば、それが天然には見出されない植物ゲノム中に、または細菌プラスミドまたはウイルスベクター等のそれが天然には見出されないレプリコンまたはベクター中に取り込まれ得る。「キメラＤＮＡ」という用語は、宿主中で複製可能であるＤＮＡ分子に限定されないが、例えば、特定のアダプター配列により、レプリコン中に連結することができるＤＮＡを含む。

【０１４９】

「導入遺伝子」は、形質転換の手法によってゲノムに導入された遺伝子である。導入遺伝子は、形質転換された植物細胞からの再生によって生成された初期の形質転換された植物、または自家受精もしくは初期の形質転換細胞からの交配によって生成された子孫植物、または種子等の植物部分中にあり得る。「遺伝的に修飾された」という用語およびその変形は、形質転換または形質導入によって遺伝子を細胞に導入することと、細胞中の遺伝子を突然変異させることと、細胞中の遺伝子または上記のように修飾された任意の細胞の子孫の遺伝子の調節を遺伝的に改変または調整することとを含む。

【０１５０】

本明細書で使用される「ゲノム領域」は、導入遺伝子または導入遺伝子の群（本明細書では、クラスターとも称される）が、細胞またはその祖先に挿入され、そのため、それらが、減数分裂後、子孫細胞中に共に遺伝する、ゲノム内の位置を指す。

【０１５１】

本発明の「組み換えポリヌクレオチド」または「外因性ポリヌクレオチド」は、人工的な組み換え方法によって構築または修飾された核酸分子を指す。組み換えポリヌクレオチドは、その天然状態と比較して、改変された量

59

で細胞中に存在し得るか、または改変された速度で発現され得る（例えば、ｍＲＮＡの場合）。外因性ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドを天然に含まない細胞に導入されるポリヌクレオチドである。典型的には、外因性ＤＮＡは、ｍＲＮＡの転写のための鋳型として使用され、形質転換された細胞内で本発明のポリペプチドをコードするアミノ酸残基の連続する配列に翻訳される。別の実施形態において、外因性ポリヌクレオチドの一部は、細胞に対して内因性であり、その発現は、組み換え手段によって改変され、例えば、外因性制御配列が、内因性ポリヌクレオチドの上流に導入されて、形質転換された細胞がポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチドを発現することを可能にする。例えば、外因性ポリヌクレオチドは、アンチセンスＲＮＡを内因性ポリヌクレオチドに発現させ得る。

【０１５２】

本発明の組み換えポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドが存在する細胞ベースのまたは無細胞発現系の他の成分から分離されていないポリヌクレオチドと、この細胞ベースのまたは無細胞発現系において生成され、その後、少なくとも他のいくつかの成分から精製されるポリヌクレオチドとを含む。ポリヌクレオチドは、自然界に存在する隣接する一続きのヌクレオチドであり得るか、または単一のポリヌクレオチドを形成するように接合した異なる源（天然および／または合成）に由来する２つ以上の隣接する一続きのヌクレオチドを含むことができる。典型的に、そのようなキメラポリヌクレオチドは、対象となる細胞中のオープンリーディングフレームの転写を活発にするのに適しているプロモーターに作動可能に連結される本発明のポリペプチドをコードする少なくとも１つのオープンリーディングフレームを含む。

【０１５３】

定義されたポリヌクレオチドに関して、上に提供されたものよりも高い同一性%の数値が好ましい実施形態を包含することを理解されるであろう。したがって、適用できる場合、最小の同一性%の数値を考慮すると、ポリヌクレオチドは、関連する指定された配列番号と少なくとも５０%、より好ましくは少なくとも６０%、より好ましくは少なくとも６５%、より好ましくは少なくとも７０%、より好ましくは少なくとも７５%、より好ましくは少なくとも８０%、より好ましくは少なくとも８５%、より好ましくは少なくとも９０%、より好ましくは少なくとも９１%、より好ましくは少なくとも９２%、より好ましくは少なくとも９３%、より好ましくは少なくとも９４%、より好ましくは少なくとも９５%、より好ましくは少なくとも９６%、より好ましくは少なくとも９７%、より好ましくは少なくとも９８%、より好ましくは少なくとも９９%、より好ましくは少なくとも９９．１%、より好ましくは少なくとも９９．２%、より好ましくは少なくとも９９．３%、より好ましくは少なくとも９９．４%、より好ましくは少なくとも９９．５%、より好ましくは少なくとも９９．６%、より好ましくは少なくとも９９．７%、より好ましくは少なくとも９９．８%、およびさらにより好ましくは少なくとも９９．９%同一であるポリヌクレオチド配列を含むことが好ましい。

60

【０１５４】

本発明の、または本発明に有用なポリヌクレオチドは、ストリンジェントな条件下で、本明細書に定義されるポリヌクレオチドに選択的にハイブリダイズされ得る。本明細書で使用されるストリンジェントな条件とは、（１）ハイブリダイゼーション中に、ホルムアミド等の変性剤、例えば、４２℃で、０．１%（ｗ／ｖ）のウシ血清アルブミン、０．１%のＦｉｃｏｌｌ、０．１%のポリビニルピロリドン、７５０ｍＭのＮａＣｌを含むｐＨ６．５の５０ｍＭのリン酸ナトリウム緩衝液、７５ｍＭのクエン酸ナトリウムを含む５０%（ｖ／ｖ）のホルムアミドを用いること、または（２）０．２×ＳＳＣおよび０．１%のＳＤＳ中、４２℃で、５０%のホルムアミド、５×ＳＳＣ（０．７５ＭのＮａＣｌ、０．０７５Ｍのクエン酸ナトリウム）、５０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、０．１%のピロリン酸ナトリウム、５×デンハルト溶液、超音波処理したサケ精子ＤＮＡ（５０ｇ／ｍｌ）、０．１%のＳＤＳ、および１０%の硫酸デキストランを用いること、および／または（３）洗浄のために低イオン強度および高温、例えば、５０℃で、０．０１５ＭのＮａＣｌ／０．００１５Ｍのクエン酸ナトリウム／０．１%のＳＤＳを用いること、である。

【０１５５】

本発明のポリヌクレオチドは、天然の分子と比較する場合、ヌクレオチド残基の欠失、挿入、または置換である１つ以上の突然変異を有し得る。参照配列と比較して突然変異を有するポリヌクレオチドは、天然に存在し得る（つまり、天然源から単離され得る）か、または（例えば、上述のように、核酸上の部位特異的変異誘発もしくはＤＮＡシャフリングを行うことによって）合成であり得る。

【０１５６】

内因性タンパク質の発現レベルを低下させるためのポリヌクレオチド

一実施形態において、本発明の細胞／種子／植物／生物は、導入された突然変異体または外因性ポリヌクレオチドを含み、内因性酵素の生成および／または活性を下方調節する、典型的に、導入された突然変異体または外因性ポリヌクレオチドを欠いている対応する細胞と比較する場合、オレイン酸の生成の増加、好ましくはパルミチン酸およびＰＵＦＡ、例えばリノール酸の生成の減少をもたらす。そのようなポリヌクレオチドの例には、アンチセンスポリヌクレオチド、センスポリヌクレオチド、触媒ポリヌクレオチド、マイクロＲＮＡ、内因性酵素に

61

結合するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および二本鎖ＲＮＡが含まれる。

【０１５７】

ＲＮＡ干渉

ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）は、特定のタンパク質の生成を特異的に阻害するために特に有用である。この技法は、対象となる遺伝子のｍＲＮＡまたはその一部と本質的に同一である配列およびそれに相補的である配列を含むｄｓＲＮＡ分子の存在に依存する。好都合に、ｄｓＲＮＡは、組み換えベクターまたは宿主細胞における単一のプロモーターから生成することができ、センスおよびアンチセンス配列は、配列、好ましくは非関連配列によって共有結合で結合され、標的ＲＮＡまたはその相補体と同一性を有する配列がループ構造を形成することができるが、対応する転写物中のセンスおよびアンチセンス配列がループ構造を形成する結合配列を有するｄｓＲＮＡ分子を形成するようにハイブリダイズすることを可能にする。典型的に、ｄｓＲＮＡは、中断されたパリンドロームとして配置される、逆方向反復構造においてセンスおよびアンチセンス配列を有する二本鎖ＤＮＡ構築物によってコードされ、反復配列は、ｄｓＲＮＡ分子内でハイブリダイズする配列を生成するように転写され、中断配列は、ｄｓＲＮＡ分子内でループを形成するように転写される。

好適なｄｓＲＮＡ分子の設計および生成は、十分に当業者の能力内であり、具体的には、Ｗａｔｅｒｈｏｕｓｅ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）、Ｓｍｉｔｈ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）、第ＷＯ９９／３２６１９号、第ＷＯ９９／５３０５０号、第ＷＯ９９／４９０２９号、および第ＷＯ０１／３４８１５号を参照されたい。

【０１５８】

一例では、相同性を有する少なくとも部分的に二本鎖ＲＮＡ生成物（複数を含む）、好ましくは不活性化する標的ＲＮＡの領域と相補である少なくとも１９個の連続するヌクレオチドの合成を誘導するＤＮＡを導入する。したがって、ＤＮＡは、ＲＮＡに転写される場合、ハイブリダイズして、二本鎖ＲＮＡ領域を形成するセンス配列およびアンチセンス配列の両方を含む。本発明の一実施形態において、センス配列およびアンチセンス配列は、ＲＮＡに転写される場合、接合されるイントロンを含むスペーサー領域によって分離される。この配置は、より高い効率の遺伝子サイレンシングをもたらすことが示されている。二本鎖ＲＮＡ領域は、１つまたは２つのＤＮＡ領域から転写される、１つまたは２つのＲＮＡ分子を含み得る。二本鎖分子の存在は、標的遺伝子からの二本鎖ＲＮＡおよび相同ＲＮＡ転写物の両方を破壊し、標的遺伝子の活性を効率的に減少させる、または失う内因性システムからの応答を引き起こすと考えられる。

【０１５９】

ハイブリダイズするセンス配列およびアンチセンス配列

62

の長さは、それぞれ、標的ｍＲＮＡの一部に相当する少なくとも１９個の連続するヌクレオチドでなければならない。全体的な遺伝子転写物に対応する完全長配列を使用し得る。標的転写物に対するセンス配列およびアンチセンス配列の同一性の程度は、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％～１００％でなければならない。当然、ＲＮＡ分子は、分子を安定させるように作用し得る無関係の配列を含み得る。ＲＮＡ分子は、ＲＮＡポリメラーゼＩＩまたはＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーターの制御下に発現し得る。後者の例には、ｔＲＮＡまたはｓｎＲＮＡプロモーターが含まれる。

【０１６０】

好ましい低分子干渉ＲＮＡ（「ｓｉＲＮＡ」）分子は、標的ｍＲＮＡの約１９～２１個の連続ヌクレオチドと同一であるヌクレオチド配列を含む。好ましくは、ｓｉＲＮＡ配列は、ジヌクレオチドＡＡで始まり、約３０～７０％（好ましくは、３０～６０％、より好ましくは４０～６０％、より好ましくは約４５％～５５％）のＧＣ含量を含み、例えば、標準ＢＬＡＳＴ検索によって測定したとき、それを導入する生物のゲノムにおいて標的以外のいかなるヌクレオチド配列にも高い同一性パーセンテージを有さない。

【０１６１】

一例として、本発明のｄｓＲＮＡは、配列番号４９～５１のうちのいずれか１つとして提供されるヌクレオチド配列を含む（各Ｔは、Ｕである）。

【０１６２】

マイクロＲＮＡ

マイクロＲＮＡ（略称ｍｉＲＮＡ）は、概して、１９～２５ヌクレオチド（植物において、通常、２０～２４ヌクレオチド）の不完全なステムループ構造を形成するより大きな前駆体に由来する非コードＲＮＡ分子である。

【０１６３】

ｍｉＲＮＡは、標的メッセンジャーＲＮＡ転写物（ｍＲＮＡ）上の相補配列に結合し、通常、翻訳抑制または標的の分解および遺伝子サイレンシングをもたらす。

【０１６４】

植物細胞において、ｍｉＲＮＡ前駆体分子は、核内で最初に処理されると考えられる。

プリｍｉＲＮＡ（１つ以上の局所的に二本鎖または「ヘアピン」領域、ならびに、通常、ｍＲＮＡの５’「キャップ」およびポリアデニル化された尾部を含む）は、ステムループまたは折り畳み構造も含み、「プレｍｉＲＮＡ」と称されるより短いｍｉＲＮＡに処理される。植物において、プレｍｉＲＮＡは、異なるＤＩＣＥＲ様（ＤＣＬ）酵素、具体的には、ＤＣＬ－１によって切断されて、ｍｉＲＮＡ：ｍｉＲＮＡ＊二本鎖を得る。核外輸送前に、これらの二本鎖は、メチル化される。対照的に、より長いｄｓＲＮＡ領域を有するヘアピンＲＮＡ分子は

63

、具体的には、ＤＣＬ－３およびＤＣＬ－４によって処理される。

【０１６５】

細胞質において、ｍｉＲＮＡ：ｍｉＲＮＡ二本鎖からのｍｉＲＮＡ鎖は、標的認識のために、活性なＲＮＡ誘導型サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）に選択的に組み込まれる。

ＲＩＳＣ複合体は、転写後に、配列特異的な遺伝子の抑制を発揮する、アルゴノートタンパク質の特定のサブセットを含む（例えば、Ｍｉｌｌａｒ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｈｏｕｓｅ，２００５、Ｐａｓｑｕｉｎｅｌｌｉ ｅｔ ａｌ．，２００５、Ａｌｍｅｉｄａ ａｎｄ Ａｌｌｓｈｉｒｅ，２００５を参照されたい）。

【０１６６】

共抑制

遺伝子は、ゲノム中にすでに存在する、関連内因性遺伝子および／または導入遺伝子の発現を抑制することができ、これは相同依存性遺伝子サイレンシングと称される現象である。相同依存性遺伝子サイレンシングの例のほとんどは、導入遺伝子の転写レベルで機能するものと、転写後に操作されるものの２つのクラスに分類される。

【０１６７】

転写後の相同依存性遺伝子サイレンシング（すなわち、共抑制）は、トランスジェニック植物における導入遺伝子および関連内因性またはウイルス遺伝子の発現の欠失を説明する。共抑制は、多くの場合、導入遺伝子の転写物が豊富である場合に生じるが、必ずしも生じるとは限らず、それは、概して、ｍＲＮＡプロセシング、局在化、および／または分解のレベルで引き起こされると考えられる。Ｓｅｖｅｒａｌモデルは、どのように共抑制が作用するかを説明するために存在する（Ｔａｙｌｏｒ，１９９７を参照のこと）。

【０１６８】

共抑制は、余分なコピーの遺伝子またはその断片を、その発現のためのプロモーターに対してセンス方向に植物に導入することを含む。当業者は、センス断片の大きさ、標的遺伝子領域に対するその対応度、および標的遺伝子との配列同一性の程度は、変化し得ることを理解されよう。場合によっては、追加コピーの遺伝子配列は、標的植物遺伝子の発現に干渉する。共抑制アプローチを実行する方法については、国際公開第ＷＯ９７／２０９３６号および欧州特許第ＥＰ０４６５５７２号を参照する。

【０１６９】

発現ベクター

本明細書で使用される「発現ベクター」は、宿主細胞を形質転換することができ、１つ以上の特定のポリヌクレオチドの発現をもたらすことができるＤＮＡまたはＲＮＡベクターである。好ましくは、発現ベクターは、宿主細胞内で複製する、または宿主細胞ゲノムに取り込むことができる。発現ベクターは、典型的には、ウイルスまたはプラスミドである。本発明の発現ベクターには、真菌、藻類、および植物細胞を含む、本発明の宿主細胞中において機能する（すなわち、遺伝子発現を誘導する）あらゆるベクターが含まれる。

64

【０１７０】

本明細書で使用される「作動可能に連結される」は、２つ以上の核酸（例えばＤＮＡ）セグメント間の機能的関係を指す。典型的には、それは、転写配列に対する転写調節要素（プロモーター）の機能的関係を指す。例えば、プロモーターは、それが適切な細胞中においてコード配列の転写を刺激または調節する場合、本明細書に定義されるポリヌクレオチドのコード配列に作動可能に連結される。一般に、転写配列に作動可能に連結されるプロモーター転写調節要素は、その転写配列に物理的に隣接しており、すなわち、それらはシス作用性である。しかしながら、エンハンサー等のいくつかの転写調節要素は、それらが転写を増強するコード配列に物理的に隣接する必要も、近接して位置する必要もない。

【０１７１】

本発明の発現ベクターは、調節配列、例えば、転写制御配列、翻訳制御配列、複製起点、および宿主細胞と適合性であり、本発明のポリヌクレオチドの発現を制御する他の調節配列を含む。特に、本発明の発現ベクターは、転写制御配列を含む。転写制御配列は、転写の開始、伸長、および終止を制御する配列である。特に重要な転写制御配列は、プロモーター、エンハンサー、オペレーター、およびリプレッサー配列等の転写開始を制御するものである。好適な転写制御配列には、本発明の組み換え細胞のうちの少なくとも１つにおいて機能することができるあらゆる転写制御配列が含まれる。使用される調節配列の選択は、対象となる植物および／または標的器官もしくは組織等の標的生物に依存する。そのような調節配列は、植物または植物ウイルス等のあらゆる真核生物から得られ得るか、または化学的に合成され得る。様々なそのような転写制御配列が当業者に知られている。

特に好ましい転写制御配列は、構成的にまたはステージおよび／もしくは組織特異的に、植物またはその部分（複数を含む）の使用に依存して、植物中における転写を誘導する際に活性なプロモーターである。

【０１７２】

植物細胞の安定したトランスフェクションのため、またはトランスジェニック植物の構築のために適切な多くのベクターは、例えば、Ｐｏｕｗｅｌｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｖｅｃｔｏｒｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，１９８５，ｓｕｐｐ．１９８７、Ｗｅｉｓｓｂａｃｈ ａｎｄ Ｗｅｉｓｓｂａｃｈ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，１９８９、およびＧｅｌｖｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｌ

65

ａｎｔ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｋｌｕｗｅｒ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，１９９０に記載されている。典型的には、植物発現ベクターには、例えば、５’および３’調節配列の転写制御下の１つ以上のクローン化された植物遺伝子、ならびに優性選択可能なマーカーを含む。そのような植物発現ベクターには、プロモーター調節領域（例えば、誘導もしくは構成的、環境もしくは発生的調節、または細胞もしくは組織特異的発現を制御する調節領域）、転写開始出発部位、リボソーム結合部位、ＲＮＡプロセッシングシグナル、転写終結部位、および／またはポリアデニル化シグナルを含むこともできる。

【０１７３】

植物細胞中において活性である多くの構成的プロモーターが記載されている。植物中において構成的発現に好適なプロモーターには、カリフラワーモザイクウイルス（ＣａＭＶ）３５Ｓプロモーター、ゴマノハグサモザイクウイルス（ＦＭＶ）３５Ｓ、サトウキビ桿状ウイルスプロモーター、ツユクサ黄色斑紋ウイルスプロモーター、リブロース－１，５－ビス－リン酸カルボキシラーゼの小サブユニットからの光誘導性プロモーター、イネサイトゾルトリオースリン酸イソメラーゼプロモーター、アラビドプシスのアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼプロモーター、イネアクチン１遺伝子プロモーター、マンノピンシンターゼおよびオクトピンシンターゼプロモーター、Ａｄｈプロモーター、スクロースシンターゼプロモーター、Ｒ遺伝子複合体プロモーター、ならびにクロロフィルα／β結合タンパク質遺伝子プロモーターが含まれるが、これらに限定されない。これらのプロモーターは、植物中において発現されるＤＮＡベクターを作製するために使用されており、例えば、国際公開第ＷＯ８４／０２９１３号を参照されたい。これらのプロモーターのすべては、様々な型の植物発現性組み換えＤＮＡベクターを作製するために使用されている。

【０１７４】

植物の源組織、例えば、葉、種子、根、または茎の発現の目的のために、本発明において利用されるプロモーターは、これらの特定組織中において相対的に高い発現を有することが好ましい。この目的のために、組織もしくは細胞に特異的な、または増強された発現を伴う遺伝子に対する多くのプロモーターから選択することができる。文献に報告されているそのようなプロモーターの例には、エンドウ由来の葉緑体グルタミン合成ＧＳ２プロモーター、コムギ由来のクロロプラストフルクトース－１，６－ビホスファターゼプロモーター、ジャガイモ由来の核光合成ＳＴ－ＬＳ１プロモーター、セリン／トレオニンキナーゼプロモーター、およびアラビドプシスサリアナ由来のグルコアミラーゼ（ＣＨＳ）プロモーターが含まれる。

【０１７５】

66

（１）熱、（２）光（例えば、エンドウＲｂｃＳ－３Ａプロモーター、トウモロコシＲｂｃＳプロモーター）、（３）アブシジン酸等のホルモン、（４）損傷（例えば、ＷｕｎＩ）、または（５）化学物質、例えば、ジャスモン酸メチル、サリチル酸、ステロイドホルモン、アルコール、Ｓａｆｅｎｅｒｓ（第ＷＯ９７／０６２６９号）によって調節されるプロモーターを含む、環境、ホルモン、化学、および／または発育のシグナルに応答して調節される様々な植物遺伝子プロモーターも、植物細胞中におけるＲＮＡ結合タンパク質遺伝子の発現のために使用することができ、または（６）器官特異的プロモーターを用いることも有利であり得る。

【０１７６】

本明細書で使用される「植物貯蔵器官特異的プロモーター」という用語は、他の植物組織と比較した場合に、植物の貯蔵器官中における遺伝子転写を選択的に誘導するプロモーターを指す。植物貯蔵器官は、好ましくは種子である。好ましくは、プロモーターは、貯蔵器官中における対象となる遺伝子の発現を誘導するだけである、および／または植物の他の部分、例えば葉における対象となる遺伝子の発現が、ノーザンブロット分析および／またはＲＴ－ＰＣＲによって検出不能である。典型的に、プロモーターは、貯蔵器官の生育および発育の間、特に、貯蔵器官中の貯蔵化合物の合成および蓄積期の間の遺伝子の発現を活発にする。そのようなプロモーターは、植物貯蔵器官全体またはその部分だけ、例えば、双子葉植物の種子における種皮、胚、または子葉（複数を含む）、または単子葉植物の種子の内胚乳もしくはアリューロン層において遺伝子発現を活発にすることができる。

【０１７７】

他のプロモーターを使用して、特定の組織、例えば、種子または果実中においてタンパク質を発現させることもできる。β－コングリシニンに対するプロモーターまたは他の種子特異的プロモーター、例えば、ナピン、ゼイン、リニン、およびファゼオリンプロモーターを使用することができる。一実施形態において、プロモーターは、脂質生合成が行われる組織および器官中における発現を誘導する。そのようなプロモーターは、種子中における脂質組成物を修飾するために適切な時点で種子発育において作用する。一実施形態において、植物貯蔵器官特異的プロモーターは、種子特異的プロモーターである。より好ましい実施形態において、プロモーターは、植物における他の器官、例えば葉と比較して、双子葉植物の胚および／もしくは子葉、または単子葉植物の内胚乳の発現を選択的に誘導する。種子特異的発現のための好ましいプロモーターには、１）デサチュラーゼおよびエロンガーゼ等の種子中の脂質生合成および蓄積に関与する酵素をコードする遺伝子からのプロモーター、２）種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子からのプロモーター、ならびに３）種子中の炭水化物生合成および蓄積に関

67

与する酵素をコードする遺伝子からのプロモーターが含まれる。好適である種子特異的プロモーターは、亜麻リニンプロモーター（例えば、Ｃｎｌ１またはＣｎｌ２）菜種ナピン遺伝子プロモーター（米国特許第５，６０８，１５２号）、ビキアファバ（Ｖｉｃｉａ　ｆａｂａ）ＵＳＰプロモーター（Ｂａｕｍｌｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９１）、アラビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）オレオシンプロモーター（国際公開第ＷＯ９８／４５４６１号）、フォセオルスウルガリス（Ｐｈａｓｅｏｌｕｓ　ｖｕｌｇａｒｉｓ）ファゼオリンプロモーター（米国特許第５，５０４，２００号）、ブラッシカ（Ｂｒａｓｓｉｃａ）Ｂｃｅ４プロモーター（国際公開第ＷＯ９１／１３９８０号）、またはレグミンＢ４プロモーター（Ｂａｕｍｌｅｉｎ　ｅｔａｌ．，１９９２）、ならびにトウモロコシ、オオムギ、コムギ、ライムギ、イネ等の単子葉植物中において種子特異的発現をもたらすプロモーターである。好適である顕著なプロモーターは、オオムギｌｐｔ２もしくはｌｐｔ１遺伝子プロモーター（国際公開第ＷＯ９５／１５３８９号および国際公開第９５／２３２３０号）、または国際公開第ＷＯ９９／１６８９０号に記載されるプロモーター（オオムギホルデイン遺伝子、イネグルテリン遺伝子、イネオリジン遺伝子、イネプロラミン遺伝子、コムギグリアジン遺伝子、コムギグルテリン遺伝子、トウモロコシゼイン遺伝子、オートムギグルテリン遺伝子、モロコシカシリン遺伝子、ライムギセカリン遺伝子由来のプロモーター）である。他のプロモーターには、Ｂｒｏｕｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）、Ｐｏｔｅｎｚａ　ｅｔ　ａｌ．（２００４）、米国特許第２００７０１９２９０２号、および米国特許第２００３０１５９１７３号によって記載されるものが含まれる。一実施形態において、種子特異的プロモーターは、胚、子葉（複数を含む）、または内胚乳等の種子の定義された部分において選択的に発現される。子葉特異的プロモーターには、ＦＰ１プロモーター（Ｅｌｌｅｒｓｔｒｏｍ　ｅｔ　ａｌ．，１９９６）、エンドウレグミンプロモーター（Ｐｅｒｒｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０００）、およびインゲンマメフィトヘマグルトニン（ｐｈｙｔｏｈｅｍａｇｇｌｕｔｎｉｎ）プロモーター（Ｐｅｒｒｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０００）が含まれるが、これらに限定されない。さらなる実施形態において、種子特異的プロモーターは、胚中、および／または種子が発芽した後、発現されないか、または低レベルで発現されるだけである。

【０１７８】

複数のプロモーターが存在する場合、各プロモーターは独立して、同じであっても、または異なっていてもよい。

【０１７９】

５’非翻訳リーダー配列は、ポリヌクレオチドの異種遺伝子配列を発現するように選択されるプロモーターに由

68

来することができるか、または生成される酵素のコード領域に対して異種であってよく、および必要に応じて、ｍＲＮＡの翻訳を増加させるように特異的に修飾され得る。

【０１８０】

転写の終結は、発現ベクターにおける対象となるポリヌクレオチドに作動可能に連結される３’非翻訳ＤＮＡ配列によって達成される。組み換えＤＮＡ分子の３’非翻訳領域は、植物中においてＲＮＡの３’末端にアデニル酸ヌクレオチドを付加させるように機能するポリアデニル化シグナルを含む。３’非翻訳領域は、例えば、植物細胞中において発現される様々な遺伝子から得られ得る。ノパリンシンターゼ３’非翻訳領域、エンドウ小サブユニットＲｕｂｉｓｃｏ遺伝子由来の３’非翻訳領域、ダイズ７Ｓ種子貯蔵タンパク質遺伝子由来の３’非翻訳領域は、この能力において、一般に使用される。アグロオバクテリウム腫瘍誘導性（Ｔｉ）プラスミド遺伝子のポリアデニル化シグナルを含む３’転写非翻訳領域も好適である。

【０１８１】

組み換えＤＮＡ技術は、例えば、宿主細胞内のポリヌクレオチドのコピー数、それらのポリヌクレオチドを転写する効率、得られた転写物を翻訳する効率、および翻訳後修飾の効率を操作することによって、形質転換されたポリヌクレオチドの発現を向上させるために使用することができる。

【０１８２】

形質転換細胞の特定を促進するために、組み換えベクターは、望ましくは、本明細書に定義されるポリヌクレオチドの核酸配列として、またはそれに加えて、選択可能なまたはスクリーニング可能なマーカー遺伝子を含む。「マーカー遺伝子」とは、そのマーカー遺伝子を発現している細胞に明確に異なる表現型を付与し、したがって、そのマーカーを有さない細胞とそのような形質転換された細胞を区別することを可能にする遺伝子を意味する。選択可能なマーカー遺伝子は、選択剤（例えば、除草剤、抗生物質、放射線、熱、または非形質転換細胞に損傷を与える他の処理）に対する耐性に基づいて「選択」することができる特徴を持つ。スクリーニング可能なマーカー遺伝子（またはレポーター遺伝子）は、観察または試験を通して、すなわち「スクリーニング」によって特定することができる特徴（例えば、非形質転換細胞中に存在しないβ－グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、ＧＦＰ、または他の酵素活性）を持つ。例えば、米国特許第４，３９９，２１６号に記載されるように、非連結遺伝子の同時形質転換もまた、植物の形質転換における効率的なプロセスであるため、マーカー遺伝子および対象となるヌクレオチド配列を連結させる必要はない。マーカーの実際の選択は、植物細胞等の選択された細胞と組み合わせて、それが機能的（すなわち、選択的）であ

69

る限り決定的に重要ではない。

【０１８３】

植物の形質転換細胞の選択のための例示的な選択可能なマーカーには、ハイグロマイシンＢ耐性をコードするｈｙｇ遺伝子、カナマイシン、パラモマイシン、Ｇ４１８に対する耐性を付与するネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（ｎｐｔＩＩ）遺伝子、例えば、欧州特許第ＥＰ２５６２２３号に記載されるグルタチオン由来の除草剤に対する耐性を付与するラット肝臓由来のグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ遺伝子、例えば、国際公開第８７／０５３２７号に記載される過剰発現の際にホスフィノトリシン等のグルタミン合成酵素阻害剤に対する耐性を付与するグルタミン合成酵素遺伝子、例えば、欧州特許第ＥＰ２７５９５７号等の選択因子ホスフィノトリシンに対する耐性を付与するストレプトマイセスヴィリドクロモゲネス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｖｉｒｉｄｏｃｈｒｏｍｏｇｅｎｅｓ）由来のアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、例えば、Ｈｉｎｃｈｅｅ ｅｔａｌ．（１９８８）によって記載されるＮ－ホスホノメチルグリシンに対する抵抗性を付与する５－エノルシキメート－３－リン酸シンターゼ（ＥＰＳＰＳ）をコードする遺伝子、例えば、国際公開第９１／０２０７１号に記載されるビアラホスに対する耐性を付与するｂａｒ遺伝子、ブロモキシニル（Ｓｔａｌｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８８）に対する耐性を付与するクレブシーラオザエナエ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｏｚａｅｎａｅ）に由来するｂｘｎ等のニトリラーゼ遺伝子、メトトレキサート（Ｔｈｉｌｌｅｔ ｅｔ ａｌ．，１９８８）に対する耐性を付与するジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＦＲ）遺伝子、イミダゾリノン、スルフォニル尿素、もしくは他のＡＬＳ阻害化学物質（欧州特許第ＥＰ１５４，２０４号）に対する耐性を付与する突然変異アセトラクテートシンターゼ遺伝子（ＡＬＳ）、５－メチルトリプトファンに対する耐性を付与する突然変異アントラニル酸シンターゼ遺伝子、または除草剤に対する耐性を付与するダラポンデハロゲナーゼ遺伝子が含まれるが、これらに限定されない。

【０１８４】

好ましいスクリーニング可能なマーカーには、様々な発色性基質が知られているβ－グルクロニダーゼ（ＧＵＳ）酵素をコードするｕｉｄＡ遺伝子、発色性基質が知られている酵素をコードするβ－ガラクトシダーゼ遺伝子、カルシウム感受性バイオルミネセンス検出において用いられ得るエクオリン遺伝子（Ｐｒａｓｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８５）、緑色蛍光タンパク質遺伝子（Ｎｉｅｄｚ ｅｔ ａｌ．，１９９５）もしくはその誘導体、またはバイオルミネセンス検出を可能にするルシフェラーゼ（ｌｕｃ）遺伝子（Ｏｗｅｔ ａｌ．，１９８６）が含まれるが、これらに限定されない。「レポーター分子」とは、その化学的性質によって、タンパク質生成

70

物を参照することによりプロモーター活性の決定を容易にする分析的に確認できるシグナルを提供する分子を意味する。

【０１８５】

好ましくは、組み換えベクターは、植物細胞等の細胞のゲノム中に安定して組み込まれる。したがって、組み換えベクターは、ゲノム中にまたは細胞の染色体中にベクターを組み込むことを可能にする適切な要素を含むことができる。

【０１８６】

転移核酸

転移核酸は、外因性ポリヌクレオチドを細胞に送達するために使用することができ、１つ、好ましくは２つの境界配列、および対象となるポリヌクレオチドを含むことができる。転移核酸は、選択可能なマーカーをコードしても、コードしなくてもよい。好ましくは、転移核酸は、細菌におけるバイナリーベクターの部分を形成し、バイナリーベクターは、この細菌におけるベクターの複製、バイナリーベクターを含む細菌性細胞の選択もしくは維持を可能にする要素をさらに含む。真核細胞への転移の際、バイナリーベクターの転移核酸成分は、真核細胞のゲノムへの組み込みが可能である。

【０１８７】

本明細書で使用される「染色体外転移核酸」という用語は、アグロオバクテリウム属種等の細菌から植物細胞等の真核細胞に転移することができる核酸分子を指す。染色体外転移核酸は、レシピエント細胞のゲノム中においてその境界内に含まれるヌクレオチド配列の後続の組み込みによって転移することができる要素としてよく知られている遺伝要素である。この点で、転移核酸は、典型的には、２つの「境界」配列によって隣接されるが、場合によっては、一方の末端における単一の境界を使用することができ、転移核酸の第２の末端は、転移プロセスにおいてランダムに生成される。対象となるポリヌクレオチドは、典型的には、転移核酸の左境界様配列と右境界様配列との間に位置する。転移核酸内に含まれるポリヌクレオチドは、その発現、すなわち、ポリヌクレオチドの転写および／または翻訳を容易にする様々な異なるプロモーターおよびターミネーター調節要素に作動可能に連結され得る。アグロバクテリウム属種、例えば、アグロバクテリウムツメファシエンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）またはアグロバクテリウムリゾゲネス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｒｈｉｚｏｇｅｎｅｓ）由来の転移ＤＮＡ（Ｔ－ＤＮＡ）、およびその人工の変異体／突然変異体は、転移核酸の恐らく最も特徴付けられた例である。別の例は、植物由来のＴ－ＤＮＡ境界様配列を含むＰ－ＤＮＡ（「植物ＤＮＡ」）である。

【０１８８】

本明細書で使用される「Ｔ－ＤＮＡ」は、例えば、アグ

71

ロバクテリウムツメファシエンスＴｉプラスミドの、またはアグロバクテリウムリゾゲネスＲｉプラスミド由来の、またはＴ－ＤＮＡとして作用するその人工の変異体に由来するＴ－ＤＮＡを指す。Ｔ－ＤＮＡは、右および左境界配列の両方を含むＴ－ＤＮＡ全体を含み得るが、転移のためにシスにおいて必要とされる最小の配列、すなわち、右およびＴ－ＤＮＡ境界配列を含むことのみ必要である。本発明のＴ－ＤＮＡは、（存在する場合）右および左境界配列の間のどこかで、対象となるポリヌクレオチドをそれらに挿入した。ｖｉｒ遺伝子等の植物細胞へのＴ－ＤＮＡの転移のためにトランスにおいて必要とされる因子をコードする配列は、Ｔ－ＤＮＡに挿入され得るか、またはＴ－ＤＮＡと同じレプリコン上に存在し得るか、または好ましくはアグロバクテリウム宿主中における適合性レプリコン上のトランスにおいて存在する。そのような「バイナリーベクター系」は、当技術分野でよく知られている。

【０１８９】

本明細書で使用される「Ｐ－ＤＮＡ」は、植物ゲノムから単離された転移核酸、またはその人工の変異体／突然変異体を指し、各末端に、または一方の末端のみに、Ｔ－ＤＮＡ境界様配列を含む。境界様配列は、好ましくは、アグロバクテリウム属種、例えば、アグロバクテリウムツメファシエンスまたはアグロバクテリウムリゾゲネス由来のＴ－ＤＮＡ境界配列と、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％であるが、１００％未満の配列同一性を共有する。したがって、Ｐ－ＤＮＡは、Ｐ－ＤＮＡ内に含まれるヌクレオチド配列を、例えば、アグロバクテリウム由来の別の細胞に転移させるために、Ｔ－ＤＮＡの代わりに使用することができる。転移されるべき外因性ポリヌクレオチドの挿入前に、Ｐ－ＤＮＡは、クローン化を容易にするために修飾され得、好ましくは、いかなるタンパク質をコードすべきではない。Ｐ－ＤＮＡは、それが少なくとも右境界配列および好ましくは左境界配列も含むことを特徴とする。

【０１９０】

本明細書で使用される、転移核酸の「境界」配列は、植物または細菌等の選択された生物から単離され得るか、またはその人工の変異体／突然変異体であり得る。境界配列は、ポリヌクレオチドの転移を促進し、かつ容易にし、レシピエント細胞ゲノム中におけるその組み込みを容易にすることができる。一実施形態において、境界配列は、５～１００塩基対（ｂｐ）の長さ、１０～８０ｂｐの長さ、１５～７５ｂｐの長さ、１５～６０ｂｐの長さ、１５～５０ｂｐの長さ、１５～４０ｂｐの長さ、１５～３０ｂｐの長さ、１６～３０ｂｐの長さ、２０～３０ｂｐの長さ、２１～３０ｂｐの長さ、２２～３０ｂｐの長さ、２３～３０ｂｐの長さ、２４～３０ｂｐの長さ

72

、２５～３０ｂｐの長さ、または２６～３０ｂｐの長さである。アグロバクテリウム属種由来のＴ－ＤＮＡ由来の境界配列は、当技術分野においてよく知られており、Ｌａｃｒｏｉｘ ｅｔ ａｌ．（２００８）、Ｔｚｆｉｒａ ａｎｄ Ｃｉｔｏｖｓｋｙ（２００６）、およびＧｌｅｖｉｎ（２００３）に記載されているものが含まれる。

【０１９１】

従来、アグロバクテリウム属種のみが、植物細胞に遺伝子を転移するために使用されているが、現在、アグロバクテリウム属種と同様の方法で作用する、特定された／発育されている多数の系が存在する。いくつかの非アグロバクテリウム種は、近年、遺伝子転移に対してコンピテントとなるように遺伝的に修飾されている（Ｃｈｕｎｇ ｅｔ ａｌ．，２００６、Ｂｒｏｏｔｈａｅｒｔｓ ｅｔ ａｌ．，２００５）。これらには、リゾビウム属種ＮＧＲ２３４、シノリゾビウムメリロティ（Ｓｉｎｏｒｈｉｚｏｂｉｕｍ ｍｅｌｉｌｏｔｉ）およびメゾリゾビウムロティ（Ｍｅｚｏｒｈｉｚｏｂｉｕｍ ｌｏｔｉ）が含まれる。細菌は、形質転換プロセスのために必要とされる機構を有する細菌、すなわち、アグロバクテリウムＴｉプラスミド、および別々の小さいバイナリープラスミド上に存在するＴ－ＤＮＡセグメントによってコードされる一連の病原性遺伝子を提供することによって遺伝子転移に対してコンピテントとされる。この方法において操作される細菌は、異なる植物組織（葉ディスク、カルス、および卵円形組織）、単子葉植物または双子葉植物、ならびに様々な異なる植物種（例えば、タバコ、イネ）を形質転換することができる。

【０１９２】

本明細書で使用される「トランスフェクション」、「形質転換」という用語、およびそれらの変形は、通常、互換的に使用される。「トランスフェクトされた」または「形質転換された」細胞は、対象となるポリヌクレオチド（複数を含む）を導入するために操作され得るか、またはそれに由来する子孫細胞であり得る。

【０１９３】

<u>組み換え細胞</u>

本発明はまた、組み換え細胞、例えば、本明細書に定義された１つ以上のポリヌクレオチドまたはベクター、またはそれらの組み合わせで形質転換された宿主細胞である　組み換え植物細胞も提供する。「組み換え細胞」という用語は、本明細書で「トランスジェニック細胞」という用語と互換的に使用される。本発明の好適な細胞には、例えば、本明細書に記載のポリペプチドまたは酵素をコードする、本発明のポリヌクレオチドまたは組み換えベクターと形質転換され得るあらゆる細胞が含まれる。細胞は、好ましくは、それによって脂質を生成するために使用することができる細胞である。組み換え細胞は、培養における細胞、インビトロにおける細胞、または

73

例えば植物等の生物における、または例えば、種子もしくは葉の器官における細胞であり得る。好ましくは、細胞は、植物中にあり、より好ましくは植物の種子中にあり、より好ましくはベニバナ等の油糧種子植物の種子中にある。一実施形態において、植物細胞は、本明細書に記載される脂肪酸組成物を有する脂質または油を含む。

【０１９４】

ポリヌクレオチド（複数を含む）が導入される宿主細胞は、非形質転換細胞、または少なくとも１つの核酸で既に形質転換されている細胞のいずれかであり得る。そのような核酸は、脂質合成と関連していても、関連していなくてもよい。本発明の宿主細胞は、本明細書に定義されるポリペプチド（複数を含む）を内因的に（すなわち、天然に）生成することが可能であり得、その場合、それから由来する組み換え細胞は、ポリペプチド（複数を含む）を生成する増強された能力を有するか、または本発明の少なくとも１つのポリヌクレオチドで形質転換された後にのみ、当該ポリペプチド（複数を含む）を生成することが可能であり得る。一実施形態において、本発明の組み換え細胞は、非極性脂質を生成する増強された能力を有する。細胞は、原核性または真核性であり得る。好ましい宿主細胞は、酵母、藻類、および植物細胞である。好ましい実施形態において、植物細胞は、種子細胞であり、具体的には、種子の子葉または内胚乳中における細胞である。本発明の宿主細胞として有用な藻類細胞の例には、例えば、クラミドモナス種（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ　ｓｐ.）（例えば、緑藻クラミドモナス（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ　ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ））、ドゥナリエラ種（Ｄｕｎａｌｉｅｌｌａ　ｓｐ.）、ヘマトコックス種（Ｈａｅｍａｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ.）、コレラ種（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ　ｓｐ.）、スラウストキトリウム種（Ｔｈｒａｕｓｔｏｃｈｙｔｒｉｕｍ　ｓｐ.）、シゾキトリウム種（Ｓｃｈｉｚｏｃｈｙｔｒｉｕｍ　ｓｐ.）、およびボルノックス種（Ｖｏｌｖｏｘ　ｓｐ）が含まれる。

【０１９５】

宿主細胞は、発酵プロセスに適している生物、例えば、ヤローウィアリポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）または他の酵母であり得る。

【０１９６】

トランスジェニック植物

本発明はまた、本発明の外因性ポリヌクレオチドまたはポリペプチド、本発明の細胞、本発明のベクター、またはこれらの組み合わせを含む植物も提供する。「植物」という用語は、植物全体を指すが、「その部分」という用語は、植物器官（例えば、葉、茎、根、花、果実）、単細胞（例えば、花粉）、種子、種子部分、例えば胚、内胚乳、胚盤、もしくは種皮、植物組織、例えば維管束組織、植物細胞、およびそれらの子孫を指す。本明細書で使用される植物部分は、植物細胞を含む。

74

【０１９７】

本明細書で使用される「植物」という用語は、その最も広い意味で使用される。それには、草本の任意の種、観賞植物、または装飾用植物、作物もしくは穀草類（例えば、油糧種子植物、トウモロコシ、大豆）、飼料もしくは飼い葉、果物もしくは野菜植物、香草植物、木本、花植物、または木等が含まれるが、これらに限定されない。それは、植物を任意の特定の構造に限定することを意味するわけではない。それはまた、単細胞植物（例えば、微細藻）を指す。植物に関して「その部分」という用語は、植物細胞および同じものの子孫、主にコロニー（例えば、ボルボックス）に分化される複数の植物細胞、植物の発育のあらゆる段階で存在する構造、または植物組織を指す。そのような構造には、葉、茎、花、果実、ナッツ、根、種子、種皮、胚が含まれるが、これらに限定されない。「植物組織」という用語は、葉、茎、花、果実、ナッツ、根、種子に存在するものを含む分化および未分化組織、例えば、胚組織、内胚乳、真皮組織（例えば、表皮、周皮）、維管束組織（例えば、木部、師部）、または基本組織（柔組織、厚角組織、および／もしくは厚膜組織細胞を含む）、ならびに培養における細胞（例えば、単細胞、プロトプラスト、カルス、胚等）を含む。植物組織は、ｉｎ　ｐｌａｎｔａ、器官培養、組織培養、または細胞培養状態であってよい。

【０１９８】

「トランスジェニック植物」、「遺伝的に修飾された植物」、またはその変形は、同じ種、変種、または栽培品種の野生型植物においては見出されない導入遺伝子を含む植物を指す。本発明の文脈において定義されるトランスジェニック植物は、所望の植物またはその部分において、本明細書に定義される少なくとも１つのポリペプチドの生成をもたらすように組み換え技術を用いて遺伝的に修飾された植物およびそれらの子孫を含む。「トランスジェニック植物部分」は、対応する意味を有する。

【０１９９】

「種子」および「穀粒」という用語は、本明細書に使用される関連用語であり、重複する意味を有する。「穀粒」は、成熟した穀粒、例えば、収穫された穀粒またはなお植物にあるが収穫の準備が整っている穀粒を指すが、文脈に従って、吸水または発芽の後の穀粒を指すこともできる。成熟した穀粒は、一般に、約１８～２０％未満の水分含有率を有する。「種子」は、「発育中の種子」、ならびに成熟した穀粒であるが、吸水または発芽の後の穀粒ではない、「穀粒」を含む。本明細書で使用される「発育中の種子」は、典型的には、受精または開花後の植物の繁殖構造において見出される成熟前の種子を指すが、植物から単離された成熟前のかかる種子を指すこともできる。ｉｎ　ｐｌａｎｔａ法における種子発育は、一般に、早期、中期、後期の発育に分けられる。

【０２００】

本明細書で使用される「植物貯蔵器官」という用語は、例えば、タンパク質、炭水化物、脂質の形態で貯蔵エネルギーに特化した植物の部分を指す。植物貯蔵器官の例は、種子、果実、塊根、および塊茎である。本発明の好ましい植物貯蔵器官は、種子である。

【０２０１】

本明細書で使用される「栄養組織」または「栄養部分」という用語またはその変形は、植物の有性生殖のための器官、または種をつける器官、または花、果実、もしくは種子等の密接に関連した組織または器官を含まない、任意の植物組織、器官、または部分である。栄養組織および部分には、少なくとも植物の葉、幹（原木（ｂｏｌｔ）およびひこばえを含むが、頭部は含まない）、塊茎および根が含まれるが、花、花粉、種皮、胚および内胚乳を含む種子、中果皮を含む果実、種子を含む鞘、および種子を含む頭部は含まれない。一実施形態において、植物の栄養部分は、気生植物部分である。別のまたはさらなる実施形態において、栄養部分は、葉または茎等の緑色の部分である。栄養部分には、主に植物の光合成能力または関連機能を提供するまたは支援する、あるいは植物を固着することに関与するかかる部分が含まれる。

【０２０２】

本明細書で使用される「表現型的に通常」という用語は、遺伝的に修飾された植物またはその部分、特に、貯蔵器官、例えば、未修飾の植物またはその植物と比較した場合、生育し、繁殖する能力が著しく低下していない、本発明の種子を指す。一実施形態において、表現型的に通常の遺伝的に修飾された植物またはその部分は、本明細書に定義される少なくとも１つの外因性ポリヌクレオチドを含み、当該ポリヌクレオチド（複数を含む）を含まない対応する植物または部分と本質的に同一である生育または繁殖する能力を有する。好ましくは、生物量、生育速度、発芽速度、貯蔵器官の大きさ、種子の大きさ、および／または生成された生存種子の数は、同一の条件下で生育させた場合、当該外因性ポリヌクレオチドを欠いている植物のものの９０％を下回ることはない。この用語は、野生型植物と異なり得るが、商業的目的のための植物の有用性を生じさせない植物の特徴を包含しない。

【０２０３】

本発明の実施によって提供されるか、本発明の実施における使用が企図される植物は、単子葉植物および双子葉植物の両方を含む。好ましい実施形態において、本発明の植物は、作物植物（例えば、穀物および豆類、トウモロコシ、コムギ、ジャガイモ、タピオカ、イネ、モロコシ、キビ、キャッサバ、オオムギ、もしくはエンドウ）、または他の豆類である。植物は、食用の根、塊茎、葉、茎、花、または果実の生産のために生育させ得る。

植物は、野菜または鑑賞植物であってよい。本発明の植物は、ベニバナ（カルタムスチンクトリウス）、トウモロコシ（ゼアマイス）、ナタネ（ブラシカナプス、ブラシカラパ種）、他のブラシカ、例えば、ルタバガ（ブラシカナポブラシカ）、カラシ（ブラシカユンセア）、エチオピアカラシ（ブラシカカリナタ（Ｂｒａｓｓｉｃａ　ｃａｒｉｎａｔａ））、ハマナ（クラムベアビッシニカ）、カメリナ（カメリナサティバ）、サトウダイコン（ベタウルガリス（Ｂｅｔａ　ｕｌｇａｒｉｓ））、クローバー（トリフォリウム種（Ｔｒｉｆｏｌｉｕｍ　ｓｐ．））、亜麻（リナムウシタチシマム）、ムラサキウマゴヤ（メディカゴサティバ（Ｍｅｄｉｃａｇｏ　ｓａｔｉｖａ））、イネ（オリザサティバ）、ライ麦（セカレケラレ（Ｓｅｃａｌｅ　ｃｅｒａｌｅ））、モロコシ（ソルガムビコロール（Ｓｏｒｇｈｕｍ　ｂｉｃｏｌｏｒ）、ソルガムブルガレ（Ｓｏｒｇｈｕｍ　ｖｕｌｇａｒｅ））、ヒマワリ（ヘリアンサスアナス）、コムギ（トリチウムアエスチブム（Ｔｒｉｔｉｕｍ　ａｅｓｔｉｖｕｍ））、大豆（グリシンマックス）、タバコ（ニコチアナタバカム）、ジャガイモ（ソラヌムツベロスム（Ｓｏｌａｎｕｍ　ｔｕｂｅｒｏｓｕｍ））、ピーナッツ（アラキスヒポゲア）、綿実（ゴシッピウムヒルスツム）、サツマイモ（リプモエアバタツス（Ｌｏｐｍｏｅａ　ｂａｔａｔｕｓ））、キャッサバ（マニホトエスクレンタ（Ｍａｎｉｈｏｔ　ｅｓｃｕｌｅｎｔａ））、コーヒー（コフェア（Ｃｏｆｅａ）属種）、ココナッツ（ココスヌシフェラ）、パイナップル（アナナコモスス（Ａｎａｎａ　ｃｏｍｏｓｕｓ））、柑橘類の樹木（シトラス（Ｃｉｔｒｕｓ）属種）、ココア（テオブロマカカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ））、茶（カメリアセネンシス（Ｃａｍｅｌｌｉａ　ｓｅｎｅｎｓｉｓ））、バナナ（ムサ（Ｍｕｓａ）属種）、アボカド（ペルセアアメリカナ（Ｐｅｒｓｅａ　ａｍｅｒｉｃａｎａ））、イチジク（フィクスカシカ（Ｆｉｃｕｓ　ｃａｓｉｃａ））、グァバ（プシディウムグアジャバ（Ｐｓｉｄｉｕｍ　ｇｕａｊａｖａ））、マンゴー（マンギフェラインディカ（Ｍａｎｇｉｆｅｒ　ｉｎｄｉｃａ））、オリーブ（オレアユーロパエア）、パパイヤ（カリカパパヤ（Ｃａｒｉｃａ　ｐａｐａｙａ））、カシュー（アナカルデイウムオクシデンタレ）、マカデミア（マカダミアインテルグリフォリア）、アーモンド（プルヌスアミグダルス）、ジャトロファクルカス（Ｊａｔｒｏｐｈａ　ｃｕｒｃａｓ）、ルピン、ユーカリ、パーム、ナッツセージ、ポンガミア、オーツ、またはオオムギであり得る。

【０２０４】

他の好ましい植物には、Ｃ４草類、例えば、アンドロプゴンゲラルディ（Ａｎｄｒｏｐｏｇｏｎ　ｇｅｒａｒｄｉ）、Ｂｏｕｔｅｌｏｕａ　ｃｕｒｔｉｐｅｎｄｕｌａ、Ｂ．ｇｒａｃｉｌｉｓ、Ｂｕｃｈｌｏｅ　ｄａｃｔｙｌｏｉｄｅｓ、Ｐａｎｉｃｕｍ　ｖｉｒｇａｔｕｍ、Ｓｃｈｉｚａｃｈｙｒｉｕｍ　ｓｃｏｐａｒｉｕｍ、ミス

77

カンサス（Ｍｉｓｃａｎｔｈｕｓ）種、例えば、Ｍｉｓｃａｎｔｈｕｓ ｘ ｇｉｇａｎｔｅｕｓおよびＭｉｓｃａｎｔｈｕｓ ｓｉｎｅｎｓｉｓ、Ｓｏｒｇｈａｓｔｒｕｍ ｎｕｔａｎｓ、Ｓｐｏｒｏｂｏｌｕｓ ｃｒｙｐｔａｎｄｒｕｓ、スイッチグラス（Ｐａｎｉｃｕｍ ｖｉｒｇａｔｕｍ）、サトウキビ（Ｓａｃｃｈａｒｕｍ ｏｆｆｉｃｉｎａｒｕｍ）、Ｂｒａｃｈｙａｒｉａ；Ｃ３草類、例えば、Ｅｌｙｍｕｓ ｃａｎａｄｅｎｓｉｓ、豆類Ｌｅｓｐｅｄｅｚａ ｃａｐｉｔａｔａおよびＰｅｔａｌｏｓｔｅｍｕｍ ｖｉｌｌｏｓｕｍ、広葉草本Ａｓｔｅｒ ａｚｕｒｅｕｓ；ならびに木本植物、例えば、Ｑｕｅｒｃｕｓ ｅｌｌｉｐｓｏｉｄａｌｉｓおよびＱ．ｍａｃｒｏｃａｒｐａが含まれる。

【０２０５】

好ましい実施形態において、植物は、被子植物である。

【０２０６】

好ましい実施形態において、植物は、油糧種子植物、好ましくは油糧種子作物植物である。本明細書で使用される「油糧種子植物」は、植物の種子からの脂質の商業的生産のために使用される植物種である。本明細書での「商業的生産」は、収益の代わりに販売のための、脂質、好ましくは油の生産を意味する。油糧種子植物は、アブラナ（ナタネ等）、トウモロコシ、ヒマワリ、ベニバナ、大豆、モロコシ、亜麻（アマニ）、またはサトウダイコンであってよい。さらに、油糧種子植物は、他のアブラナ属、綿実、ピーナッツ、ポピー、ルタバガ、マスタード、トウゴマ、ゴマ、ベニバナ、またはナッツを生成する植物であってよい。植物は、その果実、例えば、オリーブ、アブラヤシ、またはココナッツ中において高レベルの脂質を生成することができる。本発明が適用され得る園芸植物は、レタス、エンダイブ、またはキャベツ、ブロッコリー、もしくはカリフラワーを含む野菜のアブラナ属である。本発明は、タバコ、ウリ科植物、ニンジン、イチゴ、トマト、またはコショウにおいて適用され得る。より好ましい植物は、発育中の種子が非光合成であり、「白色種子」植物としても称される、油糧種子植物であり、例えば、ベニバナ、ヒマワリ、綿実、およびトウゴマである。

【０２０７】

好ましい実施形態において、トランスジェニック植物は、その子孫が所望の表現型について分離しないように導入されたそれぞれおよびすべての遺伝子（導入遺伝子）についてホモ接合性である。トランスジェニック植物はまた、導入された導入遺伝子（複数を含む）についてヘテロ接合性、好ましくは、例えば、雑種種子から生育したＦ１子孫の場合等の導入遺伝子について一様にヘテロ接合性であってよい。そのような植物は、当技術分野でよく知られている雑種強勢等の利点を提供することができる。

【０２０８】

78

植物の形質転換

トランスジェニック植物は、概ね、Ｓｌａｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｌａｎｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ－Ｔｈｅ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｌａｎｔｓ，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ（２００３）、およびＣｈｒｉｓｔｏｕ ａｎｄ Ｋｌｅｅ，Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｐｌａｎｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ（２００４）に記載されているもの等の当技術分野で知られている技術を用いて生成することができる。

【０２０９】

本明細書で使用される「安定して形質転換する」、「安定して形質転換された」という用語およびそれらの変形は、ポリヌクレオチドが、それらの存在に対して積極的に選択する必要なく、細胞分裂の間に子孫細胞に転移されるような細胞のゲノムへのポリヌクレオチドの組み込みを指す。安定した形質転換細胞またはその子孫は、当技術分野で知られている任意の手段、例えば、染色体ＤＮＡにおけるサザンブロットまたはゲノムＤＮＡの原位置ハイブリダイゼーションによって選択および／または特定され得る。

【０２１０】

一過性発現のために、または植物細胞ゲノム中におけるＤＮＡの安定した組み込みのために、ＤＮＡが、全植物組織、植物器官、または組織培養中の外植体において細胞に導入され得るので、アグロバクテリウム媒介転移は、遺伝子を植物細胞中に導入するための広く適用可能な系である。ＤＮＡを植物細胞中に導入するためのアグロバクテリウム媒介植物を組み込むベクターの使用は、当技術分野においてよく知られている（例えば、米国特許第５１７７０１０号、同第５１０４３１０号、同第５００４８６３号、または同第５１５９１３５号を参照されたい）。転移すべきＤＮＡの領域は、境界配列によって限定され、介在性ＤＮＡ（Ｔ－ＤＮＡ）が、通常、植物ゲノム中に挿入される。さらに、Ｔ－ＤＮＡの組み込みは、再配列をほとんどもたらさない相対的に厳密なプロセスである。アグロバクテリウム媒介形質転換が効率的であるそれらの植物の変種において、遺伝子転移の容易かつ定義された性質のため、それは最適な方法である。好ましいアグロバクテリウム形質転換ベクターは、大腸菌ならびにアグロバクテリウムにおける複製が可能であり、記載されるような好都合な操作を可能にする（Ｋｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎ：Ｐｌａｎｔ ＤＮＡ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ Ａｇｅｎｔｓ，Ｈｏｈｎ ａｎｄ Ｓｃｈｅｌｌ，ｅｄｓ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．１７９－２０３（１９８５））。

【０２１１】

使用され得る加速法には、例えば、マイクロプロジェク

79

タイルボンバードメント（ｍｉｃｒｏｐｒｏｊｅｃｔｉｌｅ ｂｏｍｂａｒｄｍｅｎｔ）等が含まれる。形質転換する核酸分子を植物細胞に送達するための方法の一例は、マイクロプロジェクタイルボンバードメントである。この方法は、Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｐａｒｔｉｃｌｅ Ｂｏｍｂａｒｄｍｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｆｏｒ Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ，Ｏｘｆｏｒｄ Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ，Ｅｎｇｌａｎｄ（１９９４）によって概説されている。核酸をコーティングし、推進力によって細胞に送達され得る非生物学的粒子（マイクロプロジェクタイル）。そのような方法は、当該技術分野でよく知られている。別の実施形態において、プラスチドを安定して形質転換させることができる。高等植物におけるプラスチド形質転換について開示された方法には、選択可能なマーカーを含むＤＮＡの粒子銃送達、および相同組み換えによるプラスチドゲノムへのＤＮＡの標的化が含まれる（米国特許第５，４５１，５１３号、米国特許第５，５４５，８１８号、米国特許第５，８７７，４０２号、米国特許第５，９３２４７９号、および国際公開第ＷＯ９９／０５２６５号）。

【０２１２】

植物プロトプラストの形質転換は、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレングリコール処理、エレクトロポレーション、およびこれらの処理の組み合わせに基づいた方法を使用して達成され得る。異なる植物変種へのこれらの系の適用は、プロトプラストからその特定の植物系統を再生する能力に依存する。プロトプラストから穀類の再生のための例示的な方法が記載されている（Ｆｕｊｉｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．，１９８５、Ｔｏｒｉｙａｍａｅｔ ａｌ．，１９８６、Ａｂｄｕｌｌａｈ ｅｔ ａｌ．，１９８６）。

【０２１３】

また、細胞形質転換の他の方法を使用することができ、本方法には、花粉への直接ＤＮＡ転移によって、植物の繁殖器官への植物へのＤＮＡの直接注射によって、または、未熟胚の細胞へのＤＮＡの直接注射、続いて、乾燥した胚の再水和によって、植物中へのＤＮＡの導入が含まれるが、これらに限定されない。

【０２１４】

単一の植物プロトプラストからの、または様々な形質転換された外植片からの植物の再生、発育、および培養は、当技術分野においてよく知られている（Ｗｅｉｓｓｂａｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．，（１９８８））。この再生および生育プロセスは、典型的には、形質転換細胞の選択のステップ、それらの個々の細胞を、通常の胚発育期を経て根付き苗木期まで培養するステップを含む。トランスジェニック胚および種子は、同様に再生される。その後、得られたトランスジェニック根付き苗条を土壌等の適切な生育培地中に植える。

80

【０２１５】

外来、外因性遺伝子を含む植物の発育または再生は、当技術分野でよく知られている。

好ましくは、再生植物を自家受粉させて、ホモ接合型トランスジェニック植物を提供する。それ以外の場合、再生植物から得られた花粉は、作物学的に重要な系列の種子から生育した植物に交配する。逆に、これらの重要な系列の植物からの花粉を使用して、再生植物に受粉する。所望のポリヌクレオチドを含む本発明のトランスジェニック植物は、当業者によく知られている方法を使用して栽培される。

【０２１６】

主としてアグロバクテリウムツメファシエンスの使用による、双子葉植物を形質転換するための方法、およびトランスジェニック植物を得るための方法が、綿（米国特許第５，００４，８６３号、米国特許第５，１５９，１３５号、米国特許第５，５１８，９０８号）、大豆（米国特許第５，５６９，８３４号、米国特許第５，４１６，０１１号）、アブラナ属（米国特許第５，４６３，１７４号）、ピーナッツ（Ｃｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，１９９６）、およびエンドウマメ（Ｇｒａｎｔ ｅｔ ａｌ．，１９９５）について公開されている。

【０２１７】

外因性核酸の導入によって遺伝子変異を植物中に導入するためのコムギおよびオオムギ等の穀物植物の形質転換方法、ならびにプロトプラストまたは未成熟植物胚からの植物の再生方法は、当技術分野でよく知られており、例えば、カナダ特許第２，０９２，５８８号、オーストラリア特許第６１７８１／９４号、オーストラリア特許第６６７９３９号、米国特許第６，１００，４４７号、国際公開ＰＣＴ／米国特許第９７／１０６２１号、米国特許第５，５８９，６１７号、米国特許第６，５４１，２５７号を参照されたい。再生可能なコムギ細胞は、好ましくは、未成熟胚の胚盤、成熟胚、これらから誘導されたカルス、または分裂組織に由来する。

【０２１８】

トランスジェニック細胞および植物中の導入遺伝子の存在を確認するために、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）増幅またはサザンブロット分析は、当業者に知られている方法を使用して行われ得る。一旦トランスジェニック植物が得られると、それらを生育させて、植物組織または所望の表現型を有する部分を生成することができる。その植物組織または植物部分を収穫してもよいし、および／または種子を回収してもよい。種子は、所望の特徴を有する組織または部分を有するさらなる植物を生育させるための源として役立つことができる。

【０２１９】

アグロバクテリウムまたは他の形質転換方法を使用して

81

形成されるトランスジェニック植物は、典型的には、１つの染色体上に単一のトランスジェニック遺伝子座を含有する。

そのようなトランスジェニック植物は、付加遺伝子（複数を含む）についてヘミ接合性であると称され得る。より好ましくは、付加遺伝子（複数を含む）についてホモ接合性であるトランスジェニック植物、つまり、２つの付加遺伝子（染色体対のそれぞれの染色体上の同じ遺伝子座に１つの遺伝子）を含有するトランスジェニック植物である。ホモ接合型トランスジェニック植物は、ヘミ接合型トランスジェニック植物を自家受精させ、生成した種子の一部を発芽させ、得られた植物を対象となる遺伝子について分析することによって得られ得る。

【０２２０】

また、２つの独立して分離した外因性遺伝子または遺伝子座を含有する２つの異なるトランスジェニック植物を交配させて（掛け合わせて）、両組の遺伝子または遺伝子座を含有する子孫を生成することもできることも理解されるべきである。適切なＦ１子孫の自殖は、外因性遺伝子または遺伝子座の両方についてホモ接合性である植物を生成することができる。栄養繁殖のように、親植物への戻し交配および非トランスジェニック植物との異系交配もまた、企図される。異なる形質および作物のために一般的に用いられる他の育種方法の記載は、Ｆｅｈｒ，Ｉｎ：Ｂｒｅｅｄｉｎｇ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｃｕｌｔｉｖａｒ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ，Ｗｉｌｃｏｘ Ｊ．ｅｄ．，Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｏｆ Ａｇｒｏｎｏｍｙ，Ｍａｄｉｓｏｎ Ｗｉｓ．（１９８７）において見出され得る。

【０２２１】

ベニバナの形質転換については、特定の有用な方法がＢｅｌｉｄｅ ｅｔ ａｌ．（２０１１）によって記載される。

【０２２２】

ＴＩＬＬＩＮＧ

一実施形態において、ＴＩＬＬＩＮＧ（ゲノムにおける標的誘導の局所病変）を使用して、例えば、Δ１２デサチュラーゼ、パルミトイル－ＡＣＰチオエステラーゼ、ω６もしくはΔ６デサチュラーゼ活性をコードする遺伝子、またはそれらのうちの２つ以上の組み合わせの内因性遺伝子をノックアウトする植物を生成することができる。

【０２２３】

第一のステップにおいて、新規の単一の塩基対変化等の導入する突然変異を、種子（または花粉）を化学的変異原で処理することによって、植物集団に誘導し、その後、植物を突然変異が安定に遺伝される世代へと進ませる。ＤＮＡを抽出し、集団のすべてのメンバーからの種子を貯蔵し、長時間繰り返してアクセスすることができる供給源を作製する。

82

【０２２４】

ＴＩＬＬＩＮＧアッセイために、ＰＣＲプライマーが、対象となる単一の遺伝子標的を特異的に増幅するように設計される。標的が遺伝子ファミリーのメンバーまたは倍数体ゲノムの一部である場合、特異性が、特に重要である。次に、色素標識したプライマーを使用して、複数の個人のプールしたＤＮＡからＰＣＲ生成物を増幅することができる。これらのＰＣＲ生成物を変性させ、再度アニーリングして、ミスマッチの塩基対の形成を可能にする。ミスマッチまたはヘテロ二本鎖は、天然の単一ヌクレオチド多型（ＳＮＰ）（すなわち、集団に由来するいくつかの植物が、同じ多型を有すると考えられる）および誘導されたＳＮＰ（すなわち、ごく少数の植物が突然変異を示すと考えられる）の両方を表す。ヘテロ二本鎖の形成後、ミスマッチＤＮＡを認識し、切断するＣｅｌＩ等のエンドヌクレオチドの使用が、ＴＩＬＬＩＮＧ集団内で新規ＳＮＰを発見するのに重要である。

【０２２５】

このアプローチを使用して、何千もの植物をスクリーニングして、ゲノムの任意の遺伝子または特異的領域中に単一の塩基対変化、ならびにわずかな挿入または欠失（１～３０ｂｐ）を有する個体を特定し得る。アッセイされるゲノム断片は、０．３～１．６ｋｂのサイズ範囲とし得る。８倍のプール、１．４ｋｂの断片（ＳＮＰ検出がノイズのため問題がある断片の末端はカウントしない）およびアッセイあたり９６レーンで、この組み合わせにより、ゲノムＤＮＡの最大百万の塩基対を単回のアッセイでスクリーニングすることが可能となり、これは、ＴＩＬＬＩＮＧをハイスループット手法にする。

ＴＩＬＬＩＮＧは、さらに、Ｓｌａｄｅ ａｎｄ Ｋｎａｕｆ（２００５）、およびＨｅｎｉｋｏｆｆ ｅｔ ａｌ．（２００４）において記載されている。

【０２２６】

突然変異の効率的な検出を可能にすることに加えて、ハイスループットＴＩＬＬＩＮＧ手法は、天然の多型の検出のためにも理想的である。したがって、未確認の相同性ＤＮＡを既知の配列とのヘテロ二本鎖化によって精査することは、多型部位の数および位置を明らかにする。少なくともいくつかの反復数多型を含む、ヌクレオチド変化ならびにわずかな挿入および欠失が特定される。これは、Ｅｃｏｔｉｌｌｉｎｇと称される（Ｃｏｍａｉｅｔ ａｌ．，２００４）。

【０２２７】

各ＳＮＰは、数ヌクレオチド以内のそのおよその位置によって記録される。したがって、その流動性に基づいて、各ハプロタイプをアーカイブ化することができる。配列データは、ミスマッチ切断アッセイで用いられる同じ増幅ＤＮＡのアリコートを使用して、相対的に少し増加させた努力により得ることができる。単一の反応のために左または右の配列決定プライマーは、多型への近接性

83

により選択される。シークエンサーのソフトウェアは、多重アラインメントを行い、それぞれの場合においてゲルバンドで確認される塩基変化を発見する。

【０２２８】

Ｅｃｏｔｉｌｌｉｎｇは、全長を配列決定するよりもより安価で行うことができ、この方法が、現在、ほとんどのＳＮＰ発見のために使用される。突然変異した植物由来のＤＮＡプールではなく、整列させた生態型ＤＮＡを含むプレートをスクリーニングすることができる。検出がほぼ塩基対の解像度で、ゲル上でなされ、背景パターンもレーン間で一定であるため、同一のサイズのバンドを一致させることができ、そのため、単一のステップでＳＮＰを発見し、遺伝型を決定することができる。このように、スクリーニングのために使用される同じＰＣＲ生成物のアリコートをＤＮＡ配列決定に供し得るという事実によって、ＳＮＰの最終的な配列決定が単純であり、効率的である。

【０２２９】

突然変異誘発手順

突然変異植物系統を生成するための技法は、当技術分野で知られている。突然変異植物を生成するために使用することができる突然変異原の例には、照射および化学変異誘発が含まれる。突然変異体はまた、Ｔ－ＤＮＡ挿入およびトランスポゾン誘導型突然変異誘発のような技法によっても生成され得る。植物における任意の所望の遺伝子における突然変異は、当技術分野で知られている、人工的なジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、ＴＡＬエフェクター（ＴＡＬＥＮ）、またはＣＲＩＳＰＲ技術（Ｃａｓ９型ヌクレアーゼを使用）による部位特異的な方法において導入することができる。突然変異誘発手順は、植物の任意の親細胞、例えば、種子または組織培養中の親細胞において行われ得る。

【０２３０】

化学的突然変異原は、化学的性質、例えば、アルキル化剤、架橋剤等によって分類することができる。有用な化学的突然変異原には、Ｎ－エチル－Ｎ－ニトロソ尿素（ＥＮＵ）、Ｎ－メチル－Ｎ－ニトロソ尿素（ＭＮＵ）、塩酸プロカルバジン、クロラムブシル、シクロホスファミド、メタンスルホン酸メチル（ＭＭＳ）、メタンスルホン酸エチル（ＥＭＳ）、硫酸ジエチル、アクリルアミド単量体、トリエチレンメラミン（ＴＥＭ）、メルファラン、ナイトロジェンマスタード、ビンクリスチン、ジメチルニトロソアミン、Ｎ－メチル－Ｎ’－ニトロ－ニトロソグアニジン（ＭＮＮＧ）、７，１２ジメチルベンズアントラセン（ＤＭＢＡ）、エチレンオキシド、ヘキサメチルホスホルアミド、およびビスルファンを含むが、これらに限定されない。

【０２３１】

突然変異を誘導するための好適な照射の一例は、ガンマ照射、例えば、セシウム１３７線源によって供給される

84

ものである。ガンマ照射は、好ましくは、約６０～２００Ｋｒａｄの線量、最も好ましくは、約６０～９０Ｋｒａｄに線量で植物細胞に与えられる。

【０２３２】

植物は、典型的には、所望の遺伝的修飾を達成するために十分ではあるが、細胞の生存能および細胞が植物に再生される能力を完全に破壊するには不十分な期間、突然変異原に曝露される。

【０２３３】

上記の突然変異誘発手順は、典型的には、１０００の植物のうち少なくとも１つの頻度で対象となる遺伝子の突然変異体の生成をもたらし、突然変異した植物の集団のスクリーニングが、対象となるあらゆる遺伝子の突然変異体を特定する実行可能な手段であることを意味する。突然変異体の特定はまた、超並列ヌクレオチド配列決定技術によって達成することもできる。

【０２３４】

マーカー利用選抜

マーカー利用選抜は、古典的な繁殖プログラムにおいて反復親と戻し交配する場合に必要とされるヘテロ接合植物を選択する、広く認識されている方法である。各戻し交配世代の植物の集団は、戻し交配集団において通常は１：１の比率で存在する対象となる遺伝子についてヘテロ接合であり、その分子マーカーを使用して、遺伝子の２つの対立遺伝子を識別することができる。例えば、若い苗条からＤＮＡを抽出し、遺伝子移入された所望の形質についての特異的マーカーで試験することにより、エネルギーおよび資源をより少ない植物に集中させながら、さらなる戻し交配のための植物の早期選択がなされる。戻し交配プログラムをさらに迅速化するために、完全に種子を成熟させるのではなく、未成熟種子からの胚（開花後２５日目）を切り取り、滅菌状態下に栄養培地で生育させ得る。三つ葉の段階でＤＮＡ抽出と組み合わせて使用される「胚救助法（ｅｍｂｒｙｏ　ｒｅｓｃｕｅ）」と称される、このプロセスおよび所望の遺伝子型についての分析は、その後の反復親へのさらなる戻し交配のために温室または野外で成熟するまで育成し得る、所望の形質を持つ植物の迅速選択を可能にする。

【０２３５】

ＦＡＤ２、ＦＡＴＢ、またはＦＡＤ６遺伝子を検出することができる当技術分野で知られているあらゆる分子生物学的手法が、本発明の方法において使用することができる。そのような方法には、核酸増幅の使用、核酸配列決定、適切に標識されたプローブとの核酸ハイブリダイゼーション、一本鎖立体配座解析（ＳＳＣＡ）、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（ＤＧＧＥ）、ヘテロ二本鎖分析（ＨＥＴ）、化学的切断分析（ＣＣＭ）、触媒核酸切断、またはそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない（例えば、Ｌｅｍｉｅｕｘ，２０００、Ｌａｎｇｒｉｄｇｅ　ｅｔ　ａｌ．，２００１を参照のこと

85

）。本発明はまた、所望の表現型を与える（例えば）ＦＡＤ２、ＦＡＴＢ、またはＦＡＤ６遺伝子の対立遺伝子に連結される多型を検出するための分子マーカーの使用も含む。そのような方法には、制限断片長多型（ＲＦＬＰ）、ＲＡＰＤ、増幅断片長多型（ＡＦＬＰ）、およびマイクロサテライト（単純配列反復、ＳＳＲ）多型の検出または分析が含まれる。密接に連結されたマーカーは、Ｌａｎｇｒｉｄｇｅ ｅｔ ａｌ．（２００１）によって概説されている、バルクセグレガンド分析等の当技術分野でよく知られている方法によって容易に得ることができる。

【０２３６】

「ポリメラーゼ連鎖反応」（「ＰＣＲ」）は、「上流」および「下流」プライマーから成る「プライマーの対」または「プライマーのセット」、および重合の触媒、例えば、ＤＮＡポリメラーゼ、典型的には、熱的に安定なポリメラーゼ酵素を使用して、標的ポリヌクレオチドで複製コピーを作製する反応である。ＰＣＲのための方法は、当技術分野で知られており、例えば、「ＰＣＲ」（Ｅｄ．Ｍ．Ｊ．ＭｃＰｈｅｒｓｏｎ ａｎｄ Ｓ．ＧＭｏｌｌｅｒ（２０００） ＢＩＯＳ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ＰｕｂｌｉｓｈｅｒｓＬｔｄ，Ｏｘｆｏｒｄ）において教示される。ＰＣＲは、植物細胞から単離されたｍＲＮＡを逆転写することから得られるｃＤＮＡ上で行われ得る。しかしながら、ＰＣＲが植物細胞から単離されたゲノムＤＮＡ上で行われる場合、それは、概ね、より容易であろう。

【０２３７】

プライマーは、標的配列に配列特異的な様式でハイブリダイズし、ＰＣＲの間に伸長することが可能であるオリゴヌクレオチド配列である。単位複製配列またはＰＣＲ生成物またはＰＣＲ断片または増幅生成物は、プライマーおよび標的配列の新しく合成されたコピーを含む伸長生成物である。多重ＰＣＲ系は、１つを超える単位複製配列の同時生成をもたらす複数セットのプライマーを含む。プライマーは、標的配列と完全に一致するものであってもよいし、特定の標的配列内に制限酵素または触媒核酸認識／切断部位の導入をもたらし得る内部のミスマッチ塩基を含むものであってもよい。また、プライマーは、単位複製配列の捕捉または検出を容易にするために、さらなる配列を含む、および／または修飾もしくは標識されたヌクレオチドを含むものであってもよい。ＤＮＡの熱変性、相補配列へのプライマーのアニーリング、ポリメラーゼによるアニーリングされたプライマーの伸長の反復サイクルは、標的配列の指数関数的に増幅をもたらす。標的または標的配列または鋳型という用語は、増幅される核酸配列を指す。

【０２３８】

ヌクレオチド配列の直接配列決定のための方法は、当業者によく知られており、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ

86

ａｌ．（上記参照）およびＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（上記参照）に見出され得る。配列決定は、任意の適切な方法、例えば、ジデオキシ配列決定、化学的配列決定、またはその変形によって実施され得る。直接配列決定は、特定配列のいかなる塩基対の変異も判定するという利点を有する。

【０２３９】

ハイブリダイゼーションに基づく検出システムには、ＴａｑＭａｎアッセイおよび分子ビーコンアッセイ（米国特許第ＵＳ５，９２５，５１７号）が含まれるが、これらに限定されない。ＴａｑＭａｎアッセイ（米国特許第ＵＳ５，９６２，２３３号）は、染料の対が蛍光共鳴エネルギー転移（ＦＲＥＴ）を介して相互作用するように、一方の末端に供与体染料、他方の末端に受容体染料を有する、対立遺伝子特異的（ＡＳＯ）プローブを使用する。

【０２４０】

一実施形態において、実施例７に記載される方法を、選択および繁殖プログラムに使用して、ｏｌ突然変異を有するベニバナ植物を特定し、選択する。例えば、本方法は、

ｉ）５’－ＡＴＡＡＧＧＣＴＧＴＧＴＴＣＡＣＧＧＧＴＴＴ－３’（配列番号１４０）および５’－ＧＣＴＣＡＧＴＴＧＧＧＧＡＴＡＣＡＡＧＧＡＴ－３’（配列番号１４１）、ならびに

ｉｉ）５’－ＡＧＴＴＡＴＧＧＴＴＣＧＡＴＧＡＴＣＧＡＣＧ－３’（配列番号１４２）および５’－ＴＴＧＣＴＡＴＡＣＡＴＡＴＴＧＡＡＧＧＣＡＣＴ－３（配列番号１４３）のプライマーのセットのうちの１つまたは両方を使用して、植物から得られたゲノムＤＮＡ上で増幅反応を行うことを含む。

【０２４１】

ポリペプチド

「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、概して、互換的に使用される。

【０２４２】

ポリペプチドまたはポリペプチドの類は、参照アミノ酸配列とそのアミノ酸配列の同一性の程度（同一性％）によって、または別のものよりもある参照アミノ酸配列がより大きな同一性％を有することによって定義され得る。参照アミノ酸配列へのポリペプチドの同一性％は、典型的には、ＧＡＰ分析（Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ，１９７０、ＧＣＧプログラム）により、ギャップ生成ペナルティー＝５、ギャップ伸長ペナルティー＝０．３のパラメーターで決定される。クエリー配列は、少なくとも１００アミノ酸長であり、ＧＡＰ分析は、少なくとも１００アミノ酸の領域にわたって２つの配列を並置する。さらにより好ましくは、クエリー配列は、少なくとも２５０アミノ酸長であり、ＧＡＰ分析は、少なくとも２５０アミノ酸の領域にわたって２つの配

87

列を並置する。さらにより好ましくは、ＧＡＰ分析は、それらの長さ全体にわたって２つの配列を並置する。

ポリペプチドまたはポリペプチド類は、参照ポリペプチドと同じ酵素活性もしくは異なる活性を有し得るか、またはその活性を欠き得る。好ましくは、ポリペプチドは、参照ポリペプチドの活性の少なくとも１０％の酵素活性を有する。

【０２４３】

本明細書で使用される「生物学的に活性な断片」は、完全長参照ポリペプチドの定義された活性、例えば、Δ１２デサチュラーゼ、パルミトイル－ＡＣＰチオエステラーゼ、またはΔ６デサチュラーゼ活性を維持する本発明のポリペプチドの一部である。本明細書で使用される生物学的に活性な断片は、完全長ポリペプチドを含まない。生物学的に活性な断片は、定義された活性を維持する限り、任意のサイズの部分であり得る。好ましくは、生物学的に活性な断片は、完全長ポリペプチドの活性の少なくとも１０％を維持する。

【０２４４】

定義されたポリペプチドまたは酵素に関して、本明細書に提供されるものよりも高い同一性％の数値が、好ましい実施形態を包含することを理解されるであろう。したがって、適用できる場合、最小の同一性％の数値を考慮すると、ポリヌクレオチド／酵素は、関連する指定された配列番号と少なくとも５０％、より好ましくは少なくとも６０％、より好ましくは少なくとも６５％、より好ましくは少なくとも７０％、より好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、より好ましくは少なくとも９１％、より好ましくは少なくとも９２％、より好ましくは少なくとも９３％、より好ましくは少なくとも９４％、より好ましくは少なくとも９５％、より好ましくは少なくとも９６％、より好ましくは少なくとも９７％、より好ましくは少なくとも９８％、より好ましくは少なくとも９９％、より好ましくは少なくとも９９．１％、より好ましくは少なくとも９９．２％、より好ましくは少なくとも９９．３％、より好ましくは少なくとも９９．４％、より好ましくは少なくとも９９．５％、より好ましくは少なくとも９９．６％、より好ましくは少なくとも９９．７％、より好ましくは少なくとも９９．８％、およびさらにより好ましくは少なくとも９９．９％同一であるアミノ酸配列を含むことが好ましい。

【０２４５】

本明細書で定義されたポリペプチドのアミノ酸配列の突然変異体は、本明細書で定義された核酸中に適切な核酸を導入することによって、または所望のポリペプチドのインビトロ合成によって調製され得る。そのような突然変異には、例えば、アミノ酸配列内の残基の欠失、挿入、または置換が含まれる。欠失、挿入、または置換の組

88

み合わせが、最終構築物に達するためになされ得るが、但し、最終ポリペプチド生成物が所望の特徴を有するものとする。

【０２４６】

突然変異（改変）ポリペプチドは、当技術分野で知られているあらゆる技術を使用して、例えば、指向進化または論理的な根拠の設計戦略を使用して、調製され得る（以下を参照のこと）。突然変異／改変ＤＮＡから誘導された生成物を、Δ１２デサチュラーゼ、パルミトイル－ＡＣＰチオエステラーゼ、またはω６Δ６デサチュラーゼ活性を有するか、または欠いているかどうかを決定するために、本明細書に記載される技術を使用して、容易にスクリーニングすることができる。

【０２４７】

アミノ酸配列突然変異体を設計する際に、突然変異部位の位置および突然変異の性質は、修飾すべき特徴（複数を含む）によって異なるであろう。突然変異の部位は、例えば、（１）最初に、保存アミノ酸選択物で置換し、次いで、達成される結果に応じてより大幅に異なる選択物で置換することによって、（２）標的残基を欠失させることによって、または（３）位置した部位に隣接して他の残基を挿入することによって、個別に、または連続して修飾され得る。当業者は、非保存的置換の使用が、酵素活性の軽減を有する突然変異を生成する場合に使用することができることを理解されよう。

【０２４８】

アミノ酸配列欠失は、一般に、約１～１５残基、より好ましくは約１～１０残基、典型的には、約１～５の連続した残基であるが、特に、突然変異が酵素活性を軽減するように設計される場合、より長くなり得る。

【０２４９】

置換突然変異体は、除去されたポリペプチドにおいて少なくとも１つのアミノ酸残基と、その場所に挿入された異なる残基とを有する。酵素を不活性化するための置換的突然変異誘発について最も大きな対象となる部位には、活性部位（複数を含む）として特定される部位が含まれる。対象となる他の部位は、様々な株または種から得られた特定の残基が同一である部位である。これらの位置は、生物学的活性にとって重要であり得る。保存的置換を表１に示すが、非保存的置換は、保存的置換ではない置換である。

【０２５０】

一実施形態において、本発明のポリペプチドは、Δ１２デサチュラーゼであり、配列番号２７～３４、３６、もしくは３７のうちのいずれか１つに提供される配列、その生物学的に活性な断片、または配列番号２７～３４、３６、もしくは３７のうちのいずれか１つと少なくとも４０％同一であるアミノ酸配列を有するアミノ酸である。

【０２５１】

89

別の実施形態において、本発明のポリペプチドは、油糧種子植物の種子（油糧種子）中に存在するオレイン酸塩Δ１２デサチュラーゼであり、配列番号２７、２８、もしくは３６のうちのいずれか１つに提供される配列、その生物学的に活性な断片、または配列番号２７、２８、もしくは３６のうちのいずれか１つと少なくとも４０％同一であるアミノ酸配列を有するアミノ酸を含む。

【０２５２】

別の実施形態において、本発明のポリペプチドは、Δ１２－アセチレナーゼであり、配列番号３７に提供される配列、その生物学的に活性な断片、または配列番号３７と少なくとも４０％同一であるアミノ酸配列を有するアミノ酸を含む。

【０２５３】

別の実施形態において、本発明のポリペプチドは、パルミトレイン酸塩Δ１２デサチュラーゼであり、配列番号３５に提供される配列、その生物学的に活性な断片、または配列番号３５と少なくとも４０％同一であるアミノ酸配列を有するアミノ酸を含む。

【０２５４】

別の実施形態において、本発明のポリペプチドは、パルミトイル－ＡＣＰチオエステラーゼ（ＦＡＴＢ）であり、配列番号４４または４５のいずれか１つに提供される配列、その生物学的に活性な断片、または配列番号４４または４５のうちのいずれか１つと少なくとも４０％同一であるアミノ酸配列を有するアミノ酸を含む。

【表１】

保存的置換

元の残基	例示的な置換
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro, ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe, ala

【０２５５】

別の実施形態において、本発明のポリペプチドは、油糧種子植物の種子中に存在するパルミトイル－ＡＣＰチオエステラーゼ（ＦＡＴＢ）であり、配列番号４５に提供される配列、その生物学的に活性な断片、または配列番号４５と少なくとも４０％同一であるアミノ酸配列を有するアミノ酸を含む。

【０２５６】

別の実施形態において、本発明のポリペプチドは、Δ６デサチュラーゼであり、配列番号４８に提供される配列

90

、その生物学的に活性な断片、または配列番号４８と少なくとも４０％同一であるアミノ酸配列を有するアミノ酸を含む。

【０２５７】

本発明の酵素の好ましい特徴は、ベニバナＦＡＤ２に関して、実施例の項、具体的には、実施例２に提供される。

【０２５８】

本明細書で記載されるポリペプチドは、少なくとも１つの他のポリペプチドに対する融合物として発現され得る。好ましい実施形態において、少なくとも１つの他のポリペプチドは、融合タンパク質の安定性を向上させるポリペプチド、および融合タンパク質の精製を助けるポリペプチドから成る群から選択される。

【０２５９】

オレイン酸が高い脂質および／または油の生成

当技術分野で通常実施される技法を使用して、本発明の植物、特に種子によって生成された脂質を抽出、プロセス、精製、および分析することができる。そのような技法は、Ｆｅｒｅｉｄｏｏｎ Ｓｈａｈｉｄｉ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｆｏｏｄ Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．（２００１） Ｄ１．１．１－Ｄ１．１．１１およびＰｅｒｅｚ－Ｖｉｃｈｅｔ ａｌ．（１９９８）等の出典の文献にわたって記載され、説明される。

【０２６０】

種子油の生成

典型的に、植物種子は、調理、押圧、および／または抽出して、粗種子油を生成し、次いで、脱ガム、精製し、漂白し、脱臭する。一般に、種子を粉砕する技法は、当技術分野で知られている。例えば、油糧種子を、水分含量を例えば、８．５％に高め、０．２３～０．２７ｍｍのギャップ設定の平滑ローラを使用して薄片にすることができる。種子の種類に応じて、粉砕する前に、水を加えなくてもよい。加熱は、酵素を不活性化させ、さらなる細胞破壊を容易にし、脂肪滴を合体させ、タンパク質粒子を凝集させ、それらのすべてが、抽出プロセスを容易にする。

【０２６１】

一実施形態において、種子油の大部分は、スクリュープレスの通過によって放出される。次いで、スクリュープレスから噴出したケーキを、熱追跡カラムを使用して、例えば、ヘキサンで溶媒抽出する。代替として、押圧操作によって生成された粗種子油を、溝付きワイヤドレナージトップ有する沈降タンクを通過させて、押圧操作の間に種子油とともに発現される固体を除去することができる。ヘキサンの除去後、押圧および抽出からの固体残渣は、種子粉末であり、これらは、通常、動物の食餌として使用される。浄化種子油を、加圧式濾過器（ｐｌａ

91

ｔｅ ａｎｄ ｆｒａｍｅ ｆｉｌｔｅｒ）を通過させて、あらゆる残留する固体微粒子を除去することができる。所望により、抽出プロセスから回収した種子油は、浄化種子油と組み合わせて、混合した粗種子油を生成することができる。

【０２６２】

一旦溶媒を粗種子油から取り除くと、押圧部分および抽出部分を合わせて、通常の脂質処理手法、例えば、脱ガム、苛性精製、漂白、および脱臭等に供する。いくつかまたはすべてのステップが、例えば、飼料油用の生成経路の特性に応じて省略される場合があるが、油脂化学の適用のためには、限定された処理が必要とされる場合があり、さらなる精製ステップが必要とされる。

【０２６３】

脱ガム

脱ガムは、油の精製における早期ステップであり、その主な目的は、油からのリン脂質のほとんどの除去であり、これは、全抽出脂質のうちの約１～２％として表され得る。７０～８０℃で、粗油への、典型的には、リン酸を含有する約２％の水の添加は、リン脂質の大部分、同時に微量金属および色素の分離をもたらす。除去される不溶性物質は、主に、リン脂質とトリアシルグリセロールの混合物であり、レシチンとしても知られている。

粗種子油に濃リン酸を添加することによって、脱ガムを実施して、非水和性リン脂質を水和性形態に変換させ、存在する微量の金属をキレート化させることができる。種子油からガム質を、遠心分離によって分離する。

【０２６４】

アルカリ精製

アルカリ精製は、粗油を処理するための精製プロセスのうちの１つであり、場合によっては、中和とも称される。それは、通常、脱ガムに続き、脱色の前に来る。脱ガム後、十分な量のアルカリ溶液の添加によってその種子油を処理し、脂肪酸およびリン酸のすべてを滴定し、そのため、形成された石鹸を除去することができる。好適なアルカリ性物質には、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、水酸化リチウム、水酸化カルシウム、炭酸カルシウム、および水酸化アンモニウムが含まれる。このプロセスは、典型的には、室温で行われ、遊離脂肪酸の分画を除去する。石鹸は、遠心分離によって、または石鹸に対する溶媒への抽出によって除去され、中和された油は、水で洗浄される。必要であれば、油中の任意の過剰アルカリは、塩酸または硫酸等の好適な酸で中和され得る。

【０２６５】

漂白

漂白は、油が、窒素もしくは蒸気で、または真空下で操作されることによって、漂白土（０．２～２．０％）の存在下および酸素の不在下で、９０～１２０℃で１０～３０分間加熱される精製プロセスである。油処理におけるこのステップは、望ましくない色素（カロテノド、クロロフィル、ゴシポール等）を除去するように設計され、この工程はまた、酸化生成物、微量金属、硫黄化合物、および石鹸の痕跡を除去する。

92

【０２６６】

脱臭

脱臭は、高温（２００～２６０℃）および低圧力（０．１～1mm Ｈｇ）での油および脂肪の処理である。これは、典型的に、約０．１ｍｌ／分／１００ｍｌ（種子油）の速度で、蒸気を種子油中に導入することによって達成される。散布から約３０分後、種子油を、真空下で冷却させる。種子油は、典型的に、ガラス容器に移され、冷却下で保存される前にアルゴンを通気した。この処理は、種子油の色を改善し、あらゆる残留する遊離脂肪酸、モノアシルグリセロール、および酸化生成物を含む、大部分の揮発性物質または臭気化合物を除去する。

【０２６７】

脱ろう

脱ろうは、時折、周囲温度以下の温度（ｓｕｂ－ａｍｂｉｅｎｔ ｔｅｍｐｅｒａｔｕｒｅ）での結晶化によって、固体（ステアリン）および液体（オレイン）分画への油および脂肪の分離のために、油の商業的生産で使用されるプロセスである。それは、本来は、固体のない生成物を生成するために、綿実油に適用された。それは、典型的には、油の飽和脂肪酸含量を減少させるために使用される。

【０２６８】

エステル交換反応

エステル交換反応は、初めに、遊離脂肪酸として、または脂肪酸エステル、通常、脂肪酸エチルエステルとして、ＴＡＧから脂肪酸を放出することによって、ＴＡＧ内およびその間で脂肪酸を交換するプロセスである。分画プロセスと組み合わせる場合、エステル交換反応を使用して、脂質の脂肪酸組成を修飾することができる（Ｍａｒａｎｇｏｎｉ ｅｔ ａｌ．，１９９５）。エステル交換反応は、化学的方法または酵素的方法のいずれかを使用することができ、後者は、ＴＡＧ上の脂肪酸に対して位置特異的（ｓｎ－１／３またはｓｎ－２特異的）であり得るリパーゼを使用するか、またはその他を上回るいくつかの脂肪酸に対する選択性を有する（Ｓｐｅｒａｎｚａ ｅｔ ａｌ，２０１２）。油中のＬＣ－ＰＵＦＡの濃度を増加させる脂肪酸分画は、例えば、凍結結晶化、尿素を用いた複合体形成、分子蒸留、超臨界流体抽出法、および銀イオンの複合化のような、当技術分野で知られている方法のうちのいずれかによって達成することができる。尿素を用いた複合体形成は、油中の飽和および一価不飽和脂肪酸のレベルを低減させる際に、その簡易性および効率性において好ましい方法である（Ｇａｍｅｚ ｅｔ ａｌ．，２００３）。初めに、油のＴＡＧが、脂肪酸を、多くの場合、脂肪酸エステルの形態で

93

、加水分解によって、またはリパーゼによって、それらの成分に分割し、これらの遊離脂肪酸または脂肪酸エステルを、複合体形成のために、尿素のエタノール溶液と混合する。飽和および一価不飽和脂肪酸は、尿素と容易に合成し、冷却し、晶出して、その後、濾過によって除去され得る。非尿素で複合化した分画は、それによって、ＬＣ－ＰＵＦＡで富化される。

【０２６９】

水素化

脂肪酸の水素化は、典型的に、触媒の存在下での水素による処理を含む。非触媒の水素化は、非常に高い温度でのみ行われる。

【０２７０】

水素化は、一般に、植物油の加工において使用される。水素化は、不飽和脂肪酸を飽和脂肪酸に、場合によっては、トランス脂肪に変換する。水素化は、液体植物油から固体または半固体脂肪、例えば、マーガリン中に存在するもの等への変換をもたらす。脂肪の飽和度を変化させることは、融解範囲等のいくつかの重要な物理的特性を変化させ、そのため、液体油は半固体になる。脂肪を小麦粉と混ぜ合わせることにより、焼き製品においてより望ましい触感をもたらすため、固体または半固体脂肪は、ベーキングには好ましい。

部分的に水素化された植物油は、動物源の脂肪よりも安価であり、稠度の広い範囲で利用可能であり、他の望ましい特徴（例えば、酸化安定性の増加／より長い貯蔵期間）を有し、それらは、ほとんどの市販されている焼き菓子においてショートニングとして使用される主要な脂肪である。

【０２７１】

一実施形態において、本発明の脂質／油は、水素化されていない。脂質または油が水素化されていないことを示すものは、そのＴＡＧ中にいかなるトランス脂肪酸も存在しないことである。

【０２７２】

脂質の使用

本明細書に記載される方法によって生成される脂質、例えば、種子油、好ましくは、ベニバナ種子油は、様々な用途を有する。いくつかの実施形態において、脂質は、食用油として使用される。他の実施形態において、脂質は、精製され、潤滑油として、またはプラスチック製品の合成等の他の工業的用途のために使用される。それは、化粧品、石鹸、柔軟剤、電気絶縁材、または合成洗剤の製造に使用され得る。それは、界面活性剤または乳化剤等の農業用化学物質を生成するために使用され得る。いくつかの実施形態において、脂質を精製して、バイオディーゼルを生成する。本発明の油は、リノレン酸の不在が容易に変色しないことを意味するため、塗料またはワニス中に有利に使用され得る。

【０２７３】

94

本発明の方法を使用して生成される工業生成物は、炭化水素生成物、例えば、脂肪酸エステル、好ましくは脂肪酸メチルエステル、および／もしくは脂肪酸エチルエステル、アルカン、例えば、メタン、エタン、もしくは長鎖アルカン、長鎖アルカンの混合物、アルケン、バイオ燃料、一酸化炭素および／もしくは水素ガス、バイオアルコール、例えば、エタノール、プロパノール、もしくはブタノール、バイオ炭、または一酸化炭素、水素、およびバイオ炭の組み合わせであり得る。工業生成物は、これらの成分のうちのいずれかの混合物、例えば、アルカン、またはアルカンおよびアルケンの混合物、好ましくは、主に、（＞５０％）Ｃ４－Ｃ８アルカン、または主に、Ｃ６～Ｃ１０アルカン、または主に、Ｃ６～Ｃ８アルカンである混合物であり得る。工業生成物は、二酸化炭素でも、水でもないが、これらの分子は、工業生成物と組み合わせて生成され得る。工業生成物は、大気圧／室温で気体、または好ましくは、液体、またはバイオ炭等の固体であり得るか、またはこのプロセスは、気体成分、液体成分、および固体成分、例えば、一酸化炭素、水素ガス、アルカン、およびバイオ炭等の組み合わせで生成され得、その後、分離され得る。一実施形態において、炭化水素生成物は、主に、脂肪酸メチルエステルである。代替的な実施形態において、炭化水素生成物は、脂肪酸メチルエステル以外の生成物である。

【０２７４】

加熱が、例えば、熱分解、燃焼、ガス化によって、または酵素消化（嫌気性消化、堆肥化、発酵を含む）とともに、プロセスに適用され得る。低温ガス化は、例えば、約７００℃～約１０００℃で行われる。高温ガス化は、例えば、約１２００℃～約１６００℃で行われる。低温熱分解（低速熱分解）は、約４００℃で行われるが、高温熱分解は、約５００℃で行われる。中温消化は、約２０℃～約４０℃で行われる。高温消化は、約５０℃～約６５℃で行われる。

【０２７５】

化学的手段には、接触分解、嫌気性消化、消化、発酵、堆肥化、およびエステル交換反応が含まれるが、これらに限定されない。一実施形態において、化学的手段は、加熱とともに適用され得る触媒または触媒の混合物を使用する。このプロセスは、均一触媒、不均一触媒、および／または酵素触媒を使用し得る。一実施形態において、触媒は、遷移金属触媒、分子篩型触媒、活性アルミナ触媒、または触媒として炭酸ナトリウムである。触媒には、酸触媒、例えば硫酸、またはアルカリ触媒、例えば、水酸化カリウムもしくは水酸化ナトリウム、または他の水酸化物が含まれる。化学的手段は、脂質中の脂肪酸のエステル交換反応を含み得、このプロセスは、均一触媒、不均一触媒、および／または酵素触媒を使用し得る。変換は、熱を適用し、化学的手段を適用し得る熱分解を含み得、遷移金属触媒、分子篩型触媒、活性アルミナ

95

触媒、または触媒として炭酸ナトリウムを使用し得る。

【０２７６】

酵素的手段には、例えば、嫌気性消化、消化、発酵、堆肥化における微生物による消化、または組み換え酵素タンパク質による消化が含まれるが、これらに限定されない。

【０２７７】

バイオ燃料

本明細書で使用される「バイオ燃料」という用語は、バイオディーゼルおよびバイオアルコールを含む。バイオディーゼルは、植物、藻類、および菌類に由来する油から作製することができる。バイオアルコールは、糖の発酵から生成される。この糖は、植物（例えば、サトウキビ）から直接抽出、植物デンプン（例えば、トウモロコシまたは小麦）に由来する、またはセルロース（例えば、木、葉、または茎）から作製され得る。

【０２７８】

バイオ燃料は、現在、石油系燃料よりも生産するのに費用がかかる。加工費用に加えて、バイオ燃料穀物は、植え付け、施肥、殺虫剤および除草剤の利用、収穫、および運搬を必要とする。本発明の植物、藻類、および菌類は、バイオ燃料の費用を削減し得る。

【０２７９】

バイオ燃料の生産のための一般的な方法は、例えば、Ｍａｈｅｒ ａｎｄ Ｂｒｅｓｓｌｅｒ（２００６）、Ｍａｈｅｒ ａｎｄ Ｂｒｅｓｓｌｅｒ（２００７）、Ｇｒｅｅｎｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ．（２０１１）、Ｋａｒｍａｋａｒ ｅｔ ａｌ．（２０１０）、Ａｌｏｎｓｏ ｅｔ ａｌ．（２０１０）、Ｌｅｅ ａｎｄ Ｍｏｈａｍｅｄ（２０１０）、Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．（２０１０）、Ｇｏｎｇ ａｎｄ Ｊｉａｎｇ（２０１１）、Ｅｎｄａｌｅｗ ｅｔ ａｌ．（２０１１）、およびＳｅｍｗａｌ ｅｔ ａｌ．（２０１１）において見出され得る。

【０２８０】

バイオディーゼル

バイオディーゼル、またはアルキルエステルの生成がよく知られている。脂質からのエステル生成の３つの基本的な経路がある：１）アルコールによる脂質の塩基触媒されたエステル交換、２）メタノールによる脂質の直接酸化触媒されたエステル交換、および３）脂肪酸への脂質の変換、次いで、酸触媒作用によるアルキルエステルへの変換。

【０２８１】

脂肪酸アルキルエステルおよびグリセリルエーテルを調製するための任意の方法（グリセロールにおけるヒドロキシ基のうちの１つ、２つ、または３つがエーテル化される）が使用され得る。例えば、脂肪酸は、例えば、酸触媒または塩基触媒を用いてトリグリセリドをそれぞれ、加水分解または鹸化することによって、あるいはリパ

96

ーゼもしくはエステラーゼ等の酵素を使用することによって調製することができる。脂肪酸アルキルエステルは、酸触媒の存在下で、脂肪酸をアルコールと反応させることによって調製することができる。脂肪酸アルキルエステルはまた、酸触媒または塩基触媒の存在下で、トリグリセリドをアルコールと反応させることによっても調製することができる。グリセロールエーテルは、例えば、グリセロールを、塩基の存在下でハロゲン化アルキルと、または酸触媒の存在下でオレフィンもしくはアルコールと反応させることによって調製することができる。

【０２８２】

いくつかの好ましい実施形態において、脂質をエステル交換して、メチルエステルおよびグリセロールを生成する。いくつかの好ましい実施形態において、脂質を、触媒（例えば、水酸化カリウムまたは水酸化ナトリウム）の存在下でアルコール（例えば、メタノールまたはエタノール）と反応させて、アルキルエステルを生成する。アルキルエステルは、バイオディーゼルのために使用することができるか、または石油系燃料と混合することができる。

【０２８３】

アルキルエステルは、ディーゼル燃料と直接混合することができるか、または混合前に、水もしくは他の巣溶液で洗浄して、触媒を含む様々な不純物を除去することができる。

酸触媒を塩基で中和させることが可能である。しかしながら、このプロセスは、塩を生成する。エンジン腐食を避けるために、燃料添加組成物において塩濃度を最小限に抑えることが好ましい。その後、塩は、例えば、組成物を水で洗浄することによって、組成物から除去することができる。

【０２８４】

別の実施形態において、例えば、組成物を硫酸カルシウム等の乾燥剤に通過させることによって、組成物は、それを洗浄した後に乾燥させる。

【０２８５】

さらに別の実施形態において、ポリマー酸、例えば、スルホン酸基を含む樹脂であるＤｏｗｅｘ５０（商標）等を使用することによって、塩を生成することも洗浄ステップを使用することもなく、中性燃料添加物を得る。触媒は、エステル化およびエーテル化反応が完了した後に、濾過によって容易に除去される。

【０２８６】

バイオ燃料源としての植物トリアシルグリセロール

バイオ燃料の生成のための植物トリアシルグリセロールの使用は、Ｄｕｒｒｅｔｔ ｅｔ ａｌ．（２００８）に概説されている。簡潔に言えば、植物油は、主に、様々なトリアシルグリセロール（ＴＡＧ）から成り、分子は、グリセロールにエステル化された３つの脂肪酸鎖（通常、１８または１６個の炭素の長さ）から成る。脂肪

97

酸アシル鎖は、ガソリンおよびディーゼルに見出される分子の大半を成す脂肪族炭化水素と化学的に類似している。ガソリン中の炭化水素は、分子あたり５～１２個の炭素原子を含有し、この揮発性燃料を、空気と混合し、従来型エンジンにおいて火花で発火させる。対照的に、ディーゼル燃料成分は、典型的に、分子あたり１０～１５個の炭素原子を有し、ディーゼルエンジンにおいて得られた非常に高い圧縮によって発火させる。しかしながら、ほとんどの植物ＴＡＧは、それぞれ、１．９～４．１$mm^2\ s^{-1}$と比較して、１７．３～３２．９$mm^2\ s^{-1}$である従来型ディーゼルの粘度範囲よりもはるかに高い粘度範囲を有する（ＡＳＴＭ　Ｄ９７５、Ｋｎｏｔｈｅ　ａｎｄ　Ｓｔｅｉｄｌｅｙ，２００５）。この高い粘度は、最新ディーゼルエンジンにおいて不良な燃料微粒化をもたらし、炭素析出およびコークス化等の不完全燃焼から生じる問題を引き起こす（Ｒｙａｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９８４）。この問題を克服するために、第一級アルコール、通常、メタノールによるエステル化によって、ＴＡＧをより低粘度の脂肪酸エステルに変換する。得られた燃料は、通常、バイオディーゼルと称し、１．９～６．０$mm^2\ s^{-1}$の動的粘度を有する（ＡＳＴＭ　Ｄ６７５１）。バイオディーゼル中に見出される脂肪酸メチルエステル（ＦＡＭＥ）は、従来型ディーゼルのものほど高くない場合、同様である燃焼の高熱によって反映される、高エネルギー密度を有する（Ｋｎｏｔｈｅ，２００５）。同様に、バイオディーゼル中に見出されるＦＡＭＥのセタン価（ディーゼル発火性の尺度）は、従来型ディーゼルのものを上回る（Ｋｎｏｔｈｅ，２００５）。

【０２８７】

植物油は、主に、５つの一般的な脂肪酸、つまり、パルミチン酸塩（１６：０）、ステアリン酸塩（１８：０）、オレイン酸塩（１８：１）、リノール酸塩（１８：２）、およびリノレン酸塩（１８：３）から成るが、特定の種に応じて、より長いまたはより短い脂肪酸も、主成分であり得る。これらの脂肪酸は、アシル鎖長および二重結合の点から互いに異なり、異なる物理的特性をもたらす。それ故に、脂肪酸の混合物に由来するバイオディーゼルの燃料特性は、その組成に依存する。したがって、脂肪酸プロファイルの改変により、低温流動性、酸化安定性、およびＮＯｘ放出等のバイオディーゼルの燃料特性を改善することができる。ＴＡＧの脂肪酸組成の改変は、植物油の粘度を低減し、化学的修飾の必要をなくし、そのため、バイオ燃料の費用有効性を改善することができる。

【０２８８】

飼料

本発明の脂質／油は、その非常に高いオレイン酸含量および低レベルのリノール酸（３．２％未満）、およびパルミチン酸等の飽和脂肪酸、ならびに本質的には、ゼロレベルのリノレン酸のため、食品用途に利点を有する。これは、酸敗臭が少ない、例えば、フライドポテト等の揚げ用途のような、加熱を必要とする食品用途を理想的にする、高い酸化安定性を有する油を提供する。油は、例えば、２０または２５時間より長く、好ましくは、３０時間より長くまたは５０時間より長く、油が１１０℃で保持され得る時間の長さとして測定される高いＯＳＩ（酸化安定性指数）を有する。飽和脂肪酸が健康への悪影響と関連しているため、他の植物油と比較して低レベルの飽和脂肪酸は、健康効果を提供する。

また、それれらの油は、本来、ゼロトランス脂肪酸含量を有し、トランス脂肪酸が心臓の健康への悪影響と関連しているか、またはＬＤＬコレステロールを上昇させるため、一部の市場において望ましい。さらに、その非常に低いレベルの多価不飽和脂肪酸により、それらの油は、ＰＵＦＡのレベルを低下させ、トランス脂肪酸を生成する水素化を必要としない。それらの油はまた、肥満および糖尿病の発症または重症度を軽減させるのに有利である。それらはまた、天然の脂肪酸のみを含有するという点において食品用途に望ましい（Ｓｃａｒｔｈ　ａｎｄ　Ｔａｎｇ，２００６）。

【０２８９】

本発明の目的のために、「飼料」は、身体内に取り込まれると、（１）組織に栄養分を与えるか、もしくはそれを増大させる、またはエネルギーを共有する、および／または（２）適切な栄養状態または代謝機能を維持する、回復させる、または支援する、（腸内および／または非経口摂取を含む）ヒトまたは動物の摂取のためのあらゆる食品または調製物を含む。本発明の飼料は、乳児および／または幼児のための栄養組成物を含む。

【０２９０】

本発明の飼料は、例えば、本発明の細胞、本発明の植物、本発明の植物部分、本発明の種子、本発明の抽出物、本発明の方法の生成物、または好適な担体（複数を含む）を伴う組成物を含む。「担体」という用語は、栄養価を有してよいか、または有さなくてもよいあらゆる成分を包含するようにその最も広い意味で使用される。当業者が理解するように、担体は、それが飼料を摂取する生物に対する悪影響を及ぼさないように、飼料中における使用に適切である（または十分に低い濃度で使用され）なければならない。

【０２９１】

本発明の飼料は、本明細書に開示される方法、細胞、または生物の使用によって、直接的または間接的に生成された脂質を含む。組成物は、固体または液体の形態であってもよい。さらに、組成物は、特定の使用のために望ましい量で、食用の多量栄養素、ビタミン、および／または無機質を含んでもよい。これらのまたは他の成分の量は、組成物が正常な個人による使用、または特殊化した必要を有する個人、例えば、代謝障害等に罹患してい

る個人による使用を対象とするものかどうかに応じて変化する。

【０２９２】

食品は、その食品が油を含むように、油を１つ以上の他の成分と混合することによって生成され得るか、または１つ以上の他の成分と混合して、サラダドレッシングまたはマヨネーズ等の食品添加物を作製し得る。食品または食品添加物は、１重量％～１０重量％またはそれ以上の油を含み得る。油は、最適な組成物を提供するために他の植物油、または固形脂肪、または半固形のショートニングを提供するためにヤシ油と混合され得る。油から生成される食品または食品添加物には、サラダドレッシング、マヨネーズ、マーガリン、パン、ケーキ、ビスケット（クッキー）、クロワッサン、焼き菓子、パンケーキもしくはパンケーキミックス、カスタード、冷菓、非酪農食品が含まれる。

【０２９３】

栄養価のある好適な担体の例としては、多量栄養素、例えば、食用脂肪、炭水化物、およびタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。そのような食用脂肪の例としては、ココナッツ油、ルリヂサ油、真菌油、ブラックカレント油、大豆油、ならびにモノ－およびジ－グリセリドが挙げられるが、これらに限定されない。そのような炭水化物の例としては、グルコース、食用のラクトース、および加水分解されたデンプンが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、本発明の栄養組成物において利用され得るタンパク質の例としては、大豆タンパク質、電気透析された乳漿、電気透析された脱脂乳、またはこれらのタンパク質の加水分解物が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２９４】

ビタミンおよび無機質に関して、カルシウム、リン、カリウム、ナトリウム、塩化物、マグネシウム、マンガン、鉄、銅、亜鉛、セレン、ヨウ素、ならびにビタミンＡ、Ｅ、Ｄ、Ｃ、およびＢ複合体を、本発明の飼料組成物に添加してもよい。他のそのようなビタミンおよび無機質もまた添加してもよい。

【０２９５】

本発明の飼料組成物において利用される成分は、半精製または精製されたものに由来し得る。半精製または精製されたとは、天然材料の精製によって調製された材料を意味する。

【０２９６】

本発明の飼料組成物は、食事の補給が必要とされない場合でさえも、食品に添加されてもよい。例えば、組成物は、マーガリン、改質バター、チーズ、乳、ヨーグルト、チョコレート、キャンディ、スナック、サラダ油、料理油、料理脂肪、肉、魚、および飲料が挙げられるが、これらに限定されないあらゆる型の食品に添加されてもよい。

【０２９７】

さらに、本発明によって生成された脂質、または対象遺伝子を含み、発現するように形質転換された宿主細胞も、動物の組織、または乳脂肪酸組成または卵の脂肪酸組成をヒトまたは動物の摂取のために、あるいは動物の健康および幸福のためにより望ましいものに改変させるために動物性食品補助剤として使用してもよい。そのような動物の例には、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌおよびネコ等のペット等が含まれる。

【０２９８】

さらに、本発明の飼料は、ヒトまたは動物の摂取のために魚における脂肪酸のレベルを増加させるために水産養殖において使用することができる。

【０２９９】

本発明の好ましい飼料は、ヒトまたは他の動物のための食品または食餌として直接使用され得る、植物、種子、ならびに他の植物部分、例えば、葉、果実、および茎等である。

例えば、動物は、野外で生育させたそのような植物を直接食べ得るか、または制御された給餌においてより多くの測定された量を給餌され得る。

【０３００】

組成物

本発明は、１つ以上の脂質または本発明の方法を使用して生成された油を含む組成物、具体的には、薬学的組成物も包含する。

【０３０１】

薬学的組成物は、標準的なよく知られている無毒性の薬学的に許容される担体、アジュバント、またはビヒクル、例えば、リン酸緩衝生理食塩水、水、エタノール、ポリオール、植物油、湿潤剤、または水／油乳化剤等の乳化剤と組み合わせて、脂質のうちの１つ以上を含んでもよい。組成物は、液体または固体の形態であってもよい。例えば、組成物は、錠剤、カプセル、摂取可能な液体、粉末、局所的軟膏、またはクリームの形態であってもよい。適切な流動性は、例えば、分散の場合に必要とされる粒径を維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持することができる。また、等張剤、例えば、糖類、塩化ナトリウム等を含むことが望ましい場合がある。そのような不活性希釈剤に加えて、組成物はまた、アジュバント、例えば、湿潤剤、乳化剤および懸濁剤、甘味剤、香味剤および香料を含むことができる。

【０３０２】

懸濁液は、活性化合物に加えて、懸濁剤、例えば、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶性セルロース、アルミニウムメタヒドロオキシド、ベントナイト、寒天、およびトラガカント、またはこれらの物質の混合物を含んでもよい。

101

【０３０３】
錠剤およびカプセル等の固体投薬形態は、当技術分野でよく知られている技法を用いて調製され得る。例えば、本発明によって生成される脂質は、従来の錠剤基剤、例えば、ラクトース、スクロース、およびコーンスターチを用いて、結合剤、例えば、アカシア、コーンスターチ、またはゼラチン、崩壊剤、例えば、ジョガイモデンプンまたはアルギン酸、および滑沢剤、例えば、ステアリン酸またはステアリン酸マグネシウムと組み合わせて錠剤化することができる。カプセルは、これらの賦形剤をゼラチンカプセルに、抗酸化剤および関連脂質（複数を含む）とともに組み込むことによって調製することができる。
【０３０４】
静脈内投与のために、本発明によって生成された脂質またはそれらの誘導体を、市販製剤に組み込んでもよい。
【０３０５】
特定の脂肪酸の典型的な用量は、０．１ｍｇ～２０ｇ、１日あたり１回から５回服用（１日最高１００ｇ）であり、好ましくは、１日あたり約１０ｍｇ～約１、２、５、または１０ｇの範囲内（１回または複数回投与において服用）である。当技術分野で知られているように、最低限の約３００ｍｇ／日の脂肪酸が望ましい。しかしながら、あらゆる量の脂肪酸が対象にとって有益であることが理解されよう。
【０３０６】
本発明の薬学的組成物の可能な投与経路は、例えば、腸内および非経口を含む。例えば、液体調製物は、経口投与されてもよい。さらに、均一な混合物は、水に完全に分散され、滅菌条件下で生理学的に許容される希釈剤、防腐剤、緩衝剤、または噴射剤と混合し、噴霧剤または吸入剤を形成することができる。
【０３０７】
対象に投与すべき組成物の用量は、当業者によって決定され得、様々な要因、例えば、対象の体重、年齢、全体的健康、既往歴、免疫状態等に依存する。
【０３０８】
さらに、本発明の組成物は、化粧品の目的のために利用され得る。組成物は、混合物が形成されるように、または本発明によって生成された脂肪酸が化粧品組成物中における唯一の「活性」成分として使用され得るように、既存の化粧品組成物に添加することができる。
【実施例】
【０３０９】
実施例１．一般的な材料および方法
植物材料および生育条件
ベニバナ植物（カルタムスチンクトリウス）遺伝子型ＳＵ、Ｓ－３１７、Ｓ－５１７、ＬｅＳａｆ４９６、ＣＷ９９－ＯＬ、およびＣｉａｎｏ－ＯＬを、１６時間（２５℃）／８時間（２２℃）の昼／夜サイクル下でパーライトおよび砂壌土の鉢植え用の混合物中で、温室内で種子から生育した。高リノール酸変種である野生型変種ＳＵは、ＮＳＷのＨｅｆｆｅｒｎａｎ　Ｓｅｅｄｓから得られた。ＰＩ６０３２０８（ＬｅＳａｆ４９６，ＡＴＣ１２０５６２）およびＣＷ　９９－ＯＬ（ＡＴＣ１２０５６１）の種子は、Ａｕｓｔｒａｌｉａｎ　Ｔｅｍｐｅｒａｔｅ　Ｆｉｅｌｄ　Ｃｒｏｐｓ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎから得られた。

102

【０３１０】
葉、根、子葉、および胚軸を含むＤＮＡおよびＲＮＡ抽出のための植物組織は、発芽後の１０日目にベニバナの実生から収穫された。開花の頭部は、花が開いた初日に得られ、発育中の胚は、開花後（ＤＰＡ）７日目（早期）、１５日目（中期）、および２０日目（晩期）の3つの発育段階で収穫された。試料を、液体窒素中で直ちに冷却し、ＤＮＡおよびＲＮＡ抽出が行われるまで－８０℃で保存した。
【０３１１】
ベニバナ小花は、管状であり、主として、通常、１０％未満の異系交配で自家受粉する（Ｋｎｏｗｌｅｓ　１９６９）。風ではなく、昆虫が、野外での自家受粉のレベルを増大させ得る。授粉されていない柱頭は、数日間受容可能な状態であり得る。それぞれの頭状花（ベニバナの頭部）は、約１５～３０の痩果を含む。植物における発育中の種子の種子質量は、開花後の初めの１５日間、急速に増加する。油含量は、１０～１５ＤＡＰの期間中、５～１０倍増加し、約２８　ＤＰＡで最高レベルに達する（Ｈｉｌｌ　ａｎｄ　Ｋｎｏｗｌｅｓ　１９６８）。ベニバナ種子および植物は、開花後の約５週間で生理学的に成熟し、ほとんどの葉が茶色になり、わずかに緑がかった色が、最も遅い開花の頭部の苞葉上に残っているときには、種子が、収穫する状態にある。種子は、手で頭部を擦り合わせることによって容易に収穫された。
【０３１２】
脂質分析
迅速な脂肪酸組成分析のための単一種子からの脂質試料の単離
植物の成熟期に収穫した後、ベニバナ種子は、３７℃で３日間、その後、すぐに分析されない場合には、室温で、種子を貯蔵することによって乾燥させた。単一種子またはプールした種子は、小さな濾紙の間で粉砕し、その紙に染み込んだ滲み出た種子油を、以下に記載されるＧＣ方法によって脂肪酸組成について分析した。
【０３１３】
発芽後の半子葉からの総脂質の単離
例えば、トランスジェニック植物からの子孫種子に対するスクリーニングのために、ベニバナ種子は、ペトリ皿中の湿らせた濾紙上で１日間発芽させた。脂質分析のためにそれぞれ発芽させた種子から子葉を慎重に取り出した。それぞれの実生の残りは、土壌に移し、得られた植

103

物は、成熟するまで生育させ、トランスジェニック系統を維持する種子を収穫した。

【０３１４】

ソックスレー装置を使用した種子からの油の抽出

種子油の定量的な抽出のために、収穫したベニバナ種子を、１０５℃で一晩オーブン内で乾燥させ、Ｐｕｃｋ Ｍｉｌｌ中で１分間挽いた。挽いた種子材料（約２５０グラム）を予め計量したシンブル中に回収し、油抽出前に計量した。金属の上に一層の脱脂綿を添加した後、油を、初めに、７０～８０℃で、ソックレー装置中で溶媒（Ｐｅｔｒｏｌｅｕｍ Ｓｐｉｒｉｔ ４０～６０Ｃ）により抽出した。次いで、混合物を、１５～２０分ごとに抽出フラスコにサイフォンで吸い上げた溶媒で一晩還流した。溶解し、抽出した油を、真空下でロータリーエバポレーターを使用して溶媒から蒸発させることによって回収した。抽出した油の重量を測定し、油含有物を決定した。抽出した油の脂肪酸組成を決定するために、少量のアリコートを、クロロホルム中で希釈し、ガスクロマトグラフィーによって分析した。

【０３１５】

葉材料からの総脂質の単離

Ｂｌｉｇｈ ａｎｄ Ｄｙｅｒ（１９５９）によって記載されるように、葉組織試料を凍結乾燥させ、計量し、総脂質を、約１０mgの乾燥重量の試料から抽出した。

【０３１６】

脂質の分別

必要な場合には、予めコーティングしたシリカゲルプレート（Ｓｉｌｉｃａ ｇｅｌ ６０，Ｍｅｒｃｋ）上で、２相の薄膜クロマトグラフィー（ＴＬＣ）システムを使用して、TAG分画を、他の脂質成分から分離した。１０mgの乾燥重量の葉組織に相当する抽出した脂質試料を、第１の相でヘキサン／ジエチルエーテル（９８／２ ｖ／ｖ）を用いて、非極性ワックスを除去し、次いで、第２の相でヘキサン／ジエチルエーテル／酢酸（７０／３０／１ ｖ／ｖ／ｖ）を用いてクロマトグラフを行った。必要な場合には、第一の方向においては、クロロホルム／メタノール／水（６５／２５／４ ｖ／ｖ／ｖ）であり、第二の方向においては、クロロホルム／メタノール／NH_4OH／エチルプロピルアミン（１３０／７０／１０／１ ｖ／ｖ／ｖ／ｖ）を使用する、二次元ＴＬＣ（Ｓｉｌｉｃａ ｇｅｌ ６０，Ｍｅｒｃｋ）を使用して、等量の5mgの乾燥重量の葉の等価物から抽出された脂質試料中において、極性脂質を、非極性脂質から分離した。脂質スポットおよび同じＴＬＣプレート上で泳動させた適切な標準物を、ヨウ素蒸気への短期間の曝露により可視化し、バイアルに収集し、以下の通りにGC分析のためトランスメチル化してＦＡＭＥを生成した。

【０３１７】

脂肪酸メチルエステル（ＦＡＭＥ）の調製およびガスクロマトグラフィー（GC）分析

GCによる脂肪酸組成分析のために、上述のように調製された抽出した脂質試料を、ガラス管に移し、2mLのメタノール（Ｓｕｐｅｌｃｏ）中1M ＨＣｌ中で８０℃で3時間トランスメチル化した。室温まで冷却した後、１．3mLの０．９％ ＮａＣｌおよび８００μLのヘキサンをそれぞれの管に添加し、ＦＡＭＥをヘキサン相に抽出した。脂肪酸組成を決定するために、温度上昇プログラムを、１５０℃の初期温度に変更し、１分間維持し、３℃／分で２１０℃まで、次いで、５０℃／分で２４０℃まで上昇させ、最終的に、2分間維持することを除いては、Ｚｈｏｕ ｅｔ ａｌ．（２０１１）によって本質的に記載される、３０m ＢＰＸ７０カラムを装備したＡｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ ７８９０Aガスクロマトグラフ（Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ，ＵＳＡ）を使用するガスクロマトグラフィー（GC）によって、ＦＡＭＥを分離した。Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ ChemStationソフトウェア（Ｒｅｖ Ｂ．０３．０１（３１７），Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ，ＵＳＡ）を用いてピークを定量化した。ピーク応答は、キャリブレーションのために使用された１８：１、１８：０、２０：０、および２２：０を含む均等な比率の３１の異なる脂肪酸メチルエステルを含む真正のＮｕ－Ｃｈｅｃｋ ＧＬＣ ｓｔａｎｄａｒｄ－４１１（Ｎｕ－Ｃｈｅｃｋ Ｐｒｅｐ Ｉｎｃ，ＭＮ，ＵＳＡ）の脂肪酸に類似した。試料中のそれぞれの脂肪酸の比率を、脂肪酸における個々および総ピーク面積に基づいて計算した。

【０３１８】

ガスクロマトグラフィー（質量分析法）によるＦＡＭＥの分析

２，４－ジメチルオキサゾリン（DMOX）の修飾およびGC－MS分析によるＦＡＭＥにおける二重結合の位置の確認を、３０m ＢＰＸ７０カラムを装備したＳｈｉｍａｄｚｕ ＧＣ－ＭＳ ＱＰ２０１０ Ｐｌｕｓを用いることを除いて、前述のように行った（Ｚｈｏｕ ｅｔ ａｌ．，２０１１）。カラム温度は、１５０℃の初期温度で1分間、5℃／分で２００℃まで、次いで、１０℃／分で２４０℃まで上昇させ、5分間維持するようにプログラム化した。質量スペクトルを得て、GCMＳｓｏｌｕｔｉｏｎソフトウェア（Ｓｈｉｍａｄｚｕ，Ｖｅｒｓｉｏｎ ２．６１）で処理した。遊離脂肪酸およびＦＡＭＥスタンダードをＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ． Ｌｏｕｉｓ， ＭＯ， ＵＳＡ）から購入した。

【０３１９】

ＬＣ－ＭＳによる脂質種の分析

成熟した個々の単一種子を、Ｓｃｈｏｏｌ ｏｆ Ｂｏｔａｎｙ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｍｅｌｂｏｕ

105

rneにおいて、LC－MSを使用して、脂質全代謝物（lipidomics）の分析に供した。Bligh and Dyer（1959）によって記載されるように、総脂質を抽出し、$CHCl_3$ 中に溶解した。1mgの脂質のアリコートを、N_2 で乾燥させ、1mLのブタノール：メタノール（1：1 v／v）中10mMブチル化ヒドロキシトルエン中に溶解し、Agilent 1200シリーズLCおよび6410B エレクトロスプレーイオン化三連四重極LC－MSを使用して分析した。

Ascentis Express RP－Amideカラム（5cm×2．1mm, Supelco）および0．2mL／分の流速で、バイナリー勾配を使用して、脂質をクロマトグラフィーで分離した。移動相は、A、H_2O：メタノール：テトラヒドロフラン（50：20：30、v／v／v）中の10mM ギ酸アンモニウム；B．H_2O：メタノール：テトラヒドロフラン（5：20：75、v／v／v）中の10mM ギ酸アンモニウムであった。脂肪酸16：0、16：1 18：0、18：1、18：2、18：3を用いて、選択された中性脂質（TAGおよびDAG）ならびにホスホコリン（PC）を、25Vの衝突エネルギーおよび135Vのフラグメンターを使用して、多重反応モニタリング（MRM）によって分析した。個々のMRM TAGおよびDAGは、脂肪酸の中性損失からのアンモニア処理した前駆イオンおよびプロダクトイオンに基づいて特定された。10uM トリステアリン外部標準を用いて、TAGおよびDAGを定量化した。

【0320】

油試料のステロール含量の分析

内部標準としてC24：0 モノールのさらなるアリコートとともに約10mgの油の試料を、80% MeOH中の4mLの5% KOHを使用し、テフロンで裏打ちされたねじ蓋を取り付けたガラス管内で、80℃で2時間加熱して鹸化した。反応混合物を冷却した後、2mLのMilli－Q水を添加し、振とうし、ボルテックスすることによって、ステロールを、2mLのヘキサン：ジクロロメタン（4：1 v／v）に抽出した。混合物を遠心分離し、ステロール抽出物を除去し、2mLのMilli－Q水で洗浄した。

次いで、振とうし、遠心分離した後、ステロール抽出物を除去した。窒素ガスの蒸気を使用して、抽出物を蒸着させ、200mLのBSTFAを使用し、80℃で2時間加熱して、ステロールをシリル化した。

【0321】

ステロールのGC／GC－MS分析のために、ステロール－OTMSi誘導体を、熱ブロック上で、40℃で、窒素ガスの蒸気下で乾燥させ、次いで、GC／GC－MS分析の直前に、クロロホルムまたはヘキサン中に再溶解した。Supelco Equity（商標）－1融

106

合シリカキャピラリーカラム（15m×0．1mm すなわち、0．1μmフィルム厚）、FID、スプリット／スプリットレスインジェクターならびにAgilent Technologies 7683B Seriesオートサンプラーおよびインジェクターを備えたAgilent Technologies 6890A GC（Palo Alto, California, USA）を用いて、ガスクロマトグラフィー（GC）によりステロール－OTMS誘導体を分析した。ヘリウムが、担体ガスであった。120℃のオーブン温度で試料をスプリットレスモードで注入した。注入後、オーブン温度を、10℃min^{-1} で270℃まで上昇させ、最終的に、5℃min^{-1} で300℃まで上昇させた。Agilent Technologies ChemStationソフトウェア（Palo Alto, California, USA）を用いてピークを定量化した。GC結果は、個々の成分領域の±5%の誤差に供された。

【0322】

Finnigan Thermoquest GCQ GC－MSおよびFinnigan Thermo Electron Corporation GC－MSにおいてGC－質量分光（GC－MS）分析を行い、両方のシステムは、オンカラムインジェクターおよびThermoquest Xcaliburソフトウェア（Austin, Texas, USA）と装着した。それぞれのGCに上記のものと同様の極性のキャピラリーカラムを装着した。質量スペクトルデータを使用し、保持時間データを真正および実験室基準に対して得られたものと比較することによって、個々の成分を特定した。試料バッチと同時に、全手順のブランク分析を行った。

【0323】

IatroscanによるTAGの定量化

1μLのそれぞれの植物抽出物を、TLC－FID Iatroscan（商標）（Mitsubishi Chemical Medience Corporation－Japan）用の1つのChromarod－SIIに充填した。次いで、Chromarodラックを、70mlのヘキサン／$CHCl_3$／2－プロパノール／ギ酸（85／10．716／0．567／0．0567 v／v／v／v）溶媒系を含む平衡化した現像タンクに移した。30分間のインキュベーション後、Chromarodラックを、100℃で3分間乾燥させIatroscan MK－6s TLC－FID分析器（Mitsubishi Chemical Medience Corporation－Japan）上で直ちに走査した。DAGE内部標準およびTAGのピーク面積を、SIC－480II積分ソフトウェア（Version：7．0－E SIC System instruments Co., LTD－Japan）を

107

使用して積分する。

【０３２４】

２つのステップにおいて、ＴＡＧの定量化を行う。まず、ＤＡＧＥ内部標準を、すべての試料中で走査して、抽出収率を補正し、その後、濃縮したＴＡＧ試料を選択し、希釈する。次に、外部標準としてトリリノール酸グリセリル（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を用いて、外部校正によって第２の走査を用いて希釈した試料中でＴＡＧの量を定量化する。

【０３２５】

サッカロマイセスセレヴィシエにおける候補ＦＡＤ２遺伝子の発現

候補ＦＡＤ２　ｃＤＮＡの全オープンリーディングフレームを含むＤＮＡ断片を、ＥｃｏＲＩ断片としてｐＧＥＭＴ－ｅａｓｙベクターから切除し、ベクターｐＥＮＴＲ１１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ，ＵＳＡ）の対応する部位に挿入した。

次いで、Ｇａｔｅｗａｙ（登録商標）Ｃｌｏｎｉｎｇ組み換え技術（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，ＬａＪｏｌｌａ，ＣＡ，ＵＳＡ）を用いて、挿入物を、目的発現ベクターｐＹＥＳ２－ＤＥＳＴ５２にクローン化して、酵母細胞中において誘導的遺伝子発現のために、ＧＡＬ１プロモーターの制御下でオープンリーディングフレームに置いた。得られたプラスミド中の遺伝子配列を、ＤＮＡ配列決定によって確認した。得られたプラスミドおよび対照としてあらゆるｃＤＮＡ挿入を欠いているｐＹＥＳ２－ＤＥＳＴ５２ベクターを、酢酸リチウム媒介形質転換によってサッカロマイセスセレヴィシエ株ＹＰＨ４９９の細胞に導入した。外因性脂肪酸基質の供給を含む、または含まない酵母細胞中のこれらの候補ＦＡＤ２遺伝子の発現は、本質的には、Ｚｈｏｕ　ｅｔ　ａｌ．（２００６）によって前述される通りであった。それぞれの実験を三重に行った。

【０３２６】

一過性発現システム系における植物細胞での遺伝子発現

遺伝子は、Ｖｏｉｎｎｅｔ　ｅｔ　ａｌ．（２００３）およびWood　ｅｔ　ａｌ．（２００９）によって本質的に記載されるように、一過性発現システムを使用してニコチアナベンタミアーナ（Ｎｉｃｏｔｉａｎａ　ｂｅｎｔｈａｍｉａｎａ）葉細胞に発現された。ＣａＭＶ　３５Ｓプロモーターの制御下で、ウイルスサイレンシングサプレッサー発現Ｐ１９の構成的発現のためのベクターが、Ｐｅｔｅｒ　Ｗａｔｅｒｈｏｕｓｅ，ＣＳＩＲＯ　Ｐｌａｎｔ　Ｉｎｄｕｓｔｒｙ，Ｃａｎｂｅｒｒａ，Ａｕｓｔｒａｌｉａの実験室から得られた。キメラバイナリーベクター３５Ｓ：Ｐ１９を、アグロバクテリウムウメファシエンス株ＡＧＬ１に導入した。また、プロモーター、多くの場合、３５Ｓプロモーターから植物細胞中に発現されるコード領域を含むすべての他のバイナリーベクターを、アグロバクテリウムウメファシエンス株ＡＧＬ１に導入した。組み換え細胞は、バイナリーベクターにおける選択可能なマーカー遺伝子により、２８℃で、５０ｍｇ／Ｌのリファンピシン、および５０ｍｇ／Ｌのカナマイシンまたは８０ｍｇ／Ｌのスペクチノマイシンのいずれかが追加された５ｍＬのＬＢ培養液において定常期になるように生育させた。５ｍＭのＭＥＳ、ｐＨ５．７、５ｍＭのＭｇＳＯ４、および１００μＭのアセトシリンゴンを含む１．０ｍｌの浸潤緩衝液中に再懸濁する前に、室温で５分間、３０００ｘｇで遠心分離することによって、それぞれの培地からの細菌を、ペレット化した。次いで、再懸濁した細胞培地を、さらに３時間振とうしながら、２８℃でインキュベートした。次いで、浸潤緩衝液中のそれぞれの培地の１０倍の希釈物を、等体積の３５Ｓ：Ｐ１９倍地と混合し、同じ方法で希釈し、混合物を十分に膨張したＮ．ベンタミアーナ葉の裏面に浸潤させた。特に指定のない限り、発現すべき遺伝子を含む混合培地は、アグロバクテリウム中において３５Ｓ：Ｐ１９構築物を含んだ。対照浸潤物は、アグロバクテリウム中において３５Ｓ：Ｐ１９構築物のみを含んだ。

【０３２７】

アグロバクテリウム細胞混合物を用いて、葉を浸潤させ、植物は、一般に、総脂質の単離および脂肪酸分析のためにリーフディスクを採取する前に、浸潤後さらに５日間生育させた。Ｎ．ベンタミアーナ植物を、１４／１０時間の明／暗サイクルで、約２００ルクスの光強度を有する植物上に直接置かれたＯｓｒａｍ‘Ｓｏｆｔ　Ｗｈｉｔｅ’蛍光灯を用いて、一定の２４℃で、生育キャビネット中で生育させた。一般に、実験のために６週齢の植物を使用し、ほぼ十分に膨張した本物の葉を浸潤させた。わずかの相違を避けるために、浸潤後、浸潤していない葉をすべて、除去した。

【０３２８】

リアルタイム定量ＰＣＲ（ＲＴ－ｑＰＣＲ）

ＢＩＯＲＡＤ　ＣＦＸ９６（商標）リアルタイムＰＣＲ検出システムおよびｉＱＴＭ　ＳＹＢＲ（登録商標）Ｇｒｅｅｎ　Ｓｕｐｅｒｍｉｘ（ＢｉｏＲａｄ，　Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ，ＵＳＡ）を用いて、定量ＲＴ－ＰＣＲによって遺伝子発現分析を行った。１９～２３ヌクレオチド長で、約６５℃の融解温度（Ｔｍ）を有し、約１００～２００ｂｐの増幅生成物をもたらす遺伝子に特異的な増幅のために設計されたプライマー。ＰＣＲ反応は、９６ウェルプレート中で行った。ＲＴ－ＰＣＲ反応はすべて、三重で行われた。反応混合物は、１×ｉＱＴＭ　ＳＹＢＲ（登録商標）Ｇｒｅｅｎ　Ｓｕｐｅｒｍｉｘ（ＢｉｏＲａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ，ＵＳＡ）、５μＭ　順方向および逆方向プライマー、ならびに４００ｎｇのｃＤＮＡを含み、１ウェルあたり１０μＬの体積で使用した。熱サイクル条件は、９５℃で３分間、続いて、９５℃で１０秒間、６０℃で３０秒間、６８℃で

109

３０秒間の４０サイクルであった。６０℃から９５℃で０．１°Ｃ／秒のＰＣＲの最終ステップ後に、融解曲線分析によって、ＰＣＲ増幅の特異性をモニタリングした。さらに、ＰＣＲ生成物はまた、アガロースゲル電気泳動によって純度を確認し、シークエンスによっても確認された。構造的に発現した遺伝子ＫＡＳＩＩは、発現レベルを正規化する内因性参照として使用された。データは、対応する遺伝子発現レベルに対して較正され、その後、相対定量のために$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法を行った（Ｓｃｈｍｉｔｔｇｅｎ，２００８）。このデータは、独立した９６ウェルプレート上で行われた３つの反応の平均±標準偏差として示された。

【０３２９】

ＤＮＡ単離およびサザンブロット分析

ベニバナの実生のゲノムＤＮＡ、遺伝子型「ＳＵ」を、ＣＴＡＢ緩衝液を使用し、Ｐａｔｅｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９３）によって記載される方法に従って、十分に膨張した葉から単離した。前述（Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．，１９９９）のように、ＣｓＣｌ勾配を用いて、さらなる精製を行った。１０μｇのアリコートのベニバナゲノムＤＮＡを、８つの異なる制限酵素、すなわちＡｃｃＩ、ＢｇｌＩＩ、ＢａｍＨＩ、ＥｃｏＲＩ、ＥｃｏＲＶ、ＨｉｎｄＩＩＩ、ＸｂａＩ、およびＸｈｏＩで消化した。それぞれの制限酵素で消化されたゲノムＤＮＡは、１%のアガロースゲル上で電気泳動させた。０．５Ｍ ＮａＯＨ、１．５Ｍ ＮａＣｌ中に、ゲルを３０分間浸し、ＤＮＡをＨｙｂｏｎｄ－$Ｎ^{+}$ナイロン膜（Ａｍｅｒｓｈａｍ，ＵＫ）上にブロットした。フィルターは、低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下で、ＣｔＦＡＤ２遺伝子ファミリーの代表としてベニバナＣｔＦＡＤ２－６遺伝子の全コード領域に対応するα－$Ｐ^{32}$ ｄＣＴＰ－標識ＤＮＡ断片でプローブした。６ｘ ＳＳＰＥ、１０% デンハルト溶液、０．５% ＳＤＳ、および１００μｇ／ｍＬの変性サケ精子ＤＮＡを含む溶液中で、ハイブリダイゼーションを、６５℃で一晩行った。ハイブリダイゼーションを行い、５０℃で２ｘ ＳＳＣ／０．１% ＳＤＳ中で短時間洗浄した後、オートラジオグラフィー前に、フィルターを、０．２ｘＳＳＣ／０．１% ＳＤＳ中で、５０℃で毎回２０分間３回洗浄した。

【０３３０】

ベニバナおよびアラビドプシスサリアナの形質転換

アラビドプシスを形質転換するために使用される遺伝子を含むキメラベクターを、Ａ．ツメファシエンス株ＡＧＬ１に導入し、形質転換されたアグロバクテリウムの培地からの細胞を形質転換のためにフローラルディップ（ｆｌｏｒａｌ ｄｉｐ）法（Ｃｌｏｕｇｈａｎｄ Ｂｅｎｔ，１９９８）を用いて、Ａ．サリアナ（生態型Ｃｏｌｕｍｂｉａ）植物を処理するために使用した。形質転換されたアグロバクテリウム培地を使用して、Ｂｅｌｉ

110

ｄｅ ｅｔ ａｌ．（２０１１）によって記載されるように、形質転換されたベニバナ植物を導入した

【０３３１】

実施例２．ＦＡＤ２をコードするための候補であるベニバナｃＤＮＡの単離

総ＲＮＡ抽出およびｃＤＮＡ合成

ベニバナからｃＤＮＡを生成するために、発育中の胚、葉、根、および胚軸を含む、１００ｍｇの冷凍ベニバナ組織試料から総ＲＮＡを単離した。これは、供給者のプロトコルに従って、ＲＮｅａｓｙ（登録商標）Ｐｌａｎｔ総ＲＮＡキット（Ｑｉａｇｅｎ， Ｈｉｌｄｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して、別々にそれぞれの組織に対して行った。調製物中のＲＮＡ濃度は、ＮａｎｏＤｒｏｐ（商標）分光光度計ＮＤ１０００（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｖｉｃｔｏｒｉａ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）を用いて決定し、ＲＮＡ濃度は、分析前に均一にした。それぞれの調製物中のＲＮＡの質および相対量は、ホルムアルデヒドを含む１%（ｗ／ｖ）アガロースゲルを通じて試料のゲル電気泳動によって可視化した。ＲＮＡ調製物を、ＲＱ１ ＲＮａｓｅ－ｆｒｅｅ ＤＮａｓｅ（Ｑｉａｇｅｎ，Ｈｉｌｄｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）で処理して、汚染されているゲノムＤＮＡを除去した。Ｆｉｒｓｔ－ｓｔｒａｎｄ ｃＤＮＡを、製造業者の取扱説明書に従って、オリゴ（ｄＴ）$_{20}$プライマーを用いてＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ ＩＩＩ Ｆｉｒｓｔ－Ｓｔｒａｎｄ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｑｉａｇｅｎ， Ｈｉｌｄｅｎ， Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して、４００ｎｇのそれぞれのＤＮＡ－ｆｒｅｅ ＲＮＡ調製物から合成した。

【０３３２】

発育中の種子ｃＤＮＡライブラリーからの種子を発現したＦＡＤ２ ｃＤＮＡの単離

初めに、ベニバナ遺伝子型「ＳＵ」（野生型、高リノール酸レベル）の発育中の胚に由来するｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングすることによって、種子を発現したベニバナＦＡＤ２ ｃＤＮＡを得た。ライブラリー構築は、収穫し、液体窒素中で挽いて粉末にした、異なる発育段階の未成熟の胚の混合物からのＲＮＡ抽出から始め、製造業者の取扱説明書に従って、ＴＲＩｚｏｌ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ，ＵＳＡ）を使用してＲＮＡ抽出を行った。Ｑｉａｇｅｎ ｍＲＮＡ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ，Ｈｉｌｄｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して、ポリ（Ａ）を含有するＲＮＡを単離した。

【０３３３】

製造業者の取扱説明書に従って、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ ｃＤＮＡ合成キット（Ｓｔｒａｔａｇｅｎ，Ｌａ Ｊｏｌｌａ，ＣＡ，ＵＳＡ）を使用して、第一鎖のオリゴ（ｄＴ）プライマーｃＤＮＡを合成し、二本鎖ＤＮＡに変換した。平滑末端ｃＤＮＡを、ＥｃｏＲＩアダプター

111

で連結し、リン酸化し、Ｃｈｒｏｍａｓｐｉｎ＋ＴＥ－４００カラム（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，ＣＡ，ＵＳＡ）中のゲル濾過によってサイズ分画した。組み換えｃＤＮＡを、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ Ｐｒｅｄｉｇｅｓｔｅｄ Ｌａｍｂｄａ ＺＡＰ ＩＩ／ＥｃｏＲＩ／ＣＩＡＰクローニングキットを使用して、大腸菌株ＸＬ－１ Ｂｌｕｅ ＭＲＦ’中で繁殖させた。

【０３３４】

ＦＡＤ２クローンを特定するために、以前に記載されたプロトコル（Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．，１９９９）に従って、アラビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）ＦＡＤ２（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｌ２６２９６）のコード領域に対応するＤＮＡ断片を使用して、ライブラリーを、スクリーニングした。陽性プラークを、スクリーニングの２つの連続するラウンドを通して精製し、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ λＺＡＰＩＩ ｃＤＮＡ合成キットの取扱説明書に概説されるように、推定上のＦＡＤ２ ｃＤＮＡを含む精製したファージミドを、摘出した。ＦＡＤ２配列の配列分析を、ＮＣＢＩ Ｂｌａｓｔプログラム（www．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ＢＬＡＳＴ／）によって行った。ＶｅｃｔｏｒＮＴＩを使用することによって、オープンリーディングフレームを予測した。２つの異なる完全長ｃＤＮＡを、発育中の種子ｃＤＮＡライブラリーから単離し、それぞれ、ＣｔＦＡＤ２－１およびＣｔＦＡＤ２－２と命名した。

【０３３５】

候補ＦＡＤ２遺伝子に対するＥＳＴの特定

さらなる候補ＦＡＤ２ｃＤＮＡを特定するために、ベニバナのＣｏｍｐｏｓｉｔａｅ Ｇｅｎｏｍｅ Ｐｒｏｊｅｃｔ（ＣＧＰ）の発現配列タグ（ＥＳＴ）データベース（ｃｇｐｄｂ．ｕｃｄａｖｉｓ．ｅｄｕ／ｃｇｐｄｂ２．）を、Ａ．サリアナ（ｔｈａｌｉａｎａ）ＦＡＤ２（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｌ２６２９６）と類似性を有するポリペプチドをコードしたＥＳＴのためのプログラムＢＬＡＳＴｐを使用して精査した。少なくとも１１の、別個のＦＡＤ２ ｃＤＮＡ配列コンティグが特定され、この中で、２つのコンティグがベニバナ種子ｃＤＮＡライブラリーから単離されたＣｔＦＡＤ２－１およびＣｔＦＡＤ２－２を有する同一の配列を示した。加えて、９つの異なるｃＤＮＡを特定し、それぞれ、ＣｔＦＡＤ２－３からＣｔＦＡＤ２－１１として表記した。

【０３３６】

３’および５’ＲＡＣＥ

９つのコンティグ（ＣｔＦＡＤ２－３からＣｔＦＡＤ２－１１）のそれぞれの最も長いＥＳＴクローンが、対応する完全長ｃＤＮＡ配列の単離の出発点として選択された。プロセスは、発育中の胚、葉、根、胚軸、および花を含む様々なベニバナ組織から得たＲＮＡから生成したｃＤＮＡを使用した３’－および５’－のｃＤＮＡ末端

112

の迅速増幅（ＲＡＣＥ）を使用した。遺伝子特異的プライマー（ＧＳＰ）を、それぞれのコンティグの最も長いＥＳＴクローンから設計した。３’－ＲＡＣＥは、製造業者の取扱説明書に従って、ワンステップＲＴ－ＰＣＲキット（Ｂｉｏｌｉｎｅ， Ｌｏｎｄｏｎ， ＵＫ）を使用して行った。遺伝子特異的プライマー（ＧＳＰ）は、その３’末端でＮｏｔＩ部位でのポリ（ｄＴ）プライマーと組み合わせて選択されたＥＳＴのそれぞれのＰＣＲ増幅の第１ラウンドに使用された。ＰＣＲの第２ラウンドは、ポリ（ｄＴ）プライマーと組み合わせてネスト化されたＧＳＰを使用して第１ラウンドの生成物において行った。３’ＲＡＣＥに対するＧＳＰを表２中に列記する。

【０３３７】

５’ＲＡＣＥ Ｓｙｓｔｅｍキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ，ＵＳＡ）を用いて、ＣｔＦＡＤ２－６ ｃＤＮＡの５’末端のクローニングを行った。

遺伝子特異的プライマーＧＳＰ１、５’－ ＡＣＣＴＡＡＣＧＡＣＡＧＴＣＡＴＧＡＡＣＡＡＧ－３’（配列番号７６）を用いて、ＣｔＦＡＤ２－６ ｍＲＮＡのみをｃＤＮＡに逆転写した。ネスト化した遺伝子特異的プライマーＧＳＰ２、５’－ＧＴＧＡＧＧＡＡＡＧＣＧＧＡＧＴＧＧＡＣＡＡＣ－３’（配列番号７７）は、第１のＰＣＲ増幅中に使用した。反応条件は、ポリメラーゼを添加する前に、ホットスタートを９５℃で４分間使用し、変性を９４℃で４５秒間、アニーリングを５５℃で１分間、伸長を７２℃で２分間の３３サイクル行った。

【０３３８】

増幅した３’および５’断片を、ベクターｐＧＥＭ－Ｔｅａｓｙにサブクローンし、両方向から配列決定を行った。３’および５’末端のクローン化した断片と対応するＥＳＴとの配列比較は、互いに一致した重複する領域を示し、それによって、それぞれの遺伝子に対する３’および５’配列を提供し、１１のｃＤＮＡのそれぞれに対する推定上の完全長配列のアセンブリを可能にする。

【０３３９】

候補ＣｔＦＡＤ２遺伝子に対する完全長ｃＤＮＡ配列の単離

９つのＣｔＦＡＤ２遺伝子に対する完全長タンパク質のコード領域を単離するために、発育中の胚、葉、根、胚軸、および花を含むいくつかのベニバナ組織由来の総ＲＮＡを使用して、ワンステップＲＴ－ＰＣＲキットを使用して、ＯＲＦを増幅した（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｌａ Ｊｏｌｌａ，ＣＡ，ＵＳＡ）。ＯＲＦを増幅するために使用されたプライマー（表３）は、それぞれのｃＤＮＡの５’および３’ＵＴＲに位置するＤＮＡ配列に基づいた。増幅したＰＣＲ生成物を、ベクターｐＧＥＭ－Ｔｅａｓｙ（登録商標）にクローン化し、ＤＮＡシークエンシングによってそれらのヌクレオチド配列を得た。

【０３４０】

ベニバナ由来の候補ＦＡＤ２配列の特徴

１１のｃＤＮＡの特徴を表４中に要約し、ポリペプチドの特徴を表５中に要約した。

【０３４１】

コードしたポリペプチドＣｔＦＡＤ２－１～ＣｔＦＡＤ２－１１の予測されたアミノ酸配列は、互いに約４４％～８６％同一性のある広範囲の配列同一性を共有した。それらはアラビドプシスＦＡＤ２と５３％～６２％の配列同一性を示した。予測されたポリペプチドの大きさは、３７２～３８８アミノ酸の範囲内であった。つまり、それらはすべて、約３８０アミノ酸残基の長さであった。ｃＤＮＡは、独自の５’および３’非翻訳領域（ＵＴＲ）配列を有し、したがって、内因性遺伝子は、それらのＵＴＲ配列によって容易に認識され得た。ベニバナゲノムＤＮＡ由来のタンパク質コード領域の増幅は、１１の遺伝子のそれぞれに対して対応するｃＤＮＡを有する同一のＤＮＡ配列をもたらし、これは、それらのタンパク質コード領域を中断するイントロンがなかったことを示した。

【表２】

ベニバナにおける複数の*ＦＡＤ２*遺伝子の３’ＲＡＣＥに使用されるオリゴヌクレオチドプライマー

プライマー遺伝子	センス配列	アンチセンス配列
CtFAD2-3	5’-CTTCAGCGAGTACCAATGGCTCGAC-3’（配列番号58）	5’-GGTTTCATCGTCCACTCCTTGA-3’（配列番号59）
CtFAD2-4	5’-CTTCAGCGAGTACCAATGGCTCGAC-3’（配列番号60）	5’-GGTTTCATCGTCCACTCCTTGA-3’（配列番号61）
CtFAD2-5	5’-ATGACACCATTGGCTTCATCTGCCA-3’（配列番号62）	5’-CTTTCTGCTCACTCCATACTTC-3’（配列番号63）
CtFAD2-6	5’-AGCGAATATCAGTGGCTTGACGATG-3’（配列番号64）	5’-ACTCCGCTTTCCTCACTCCGTAC-3’（配列番号65）
CtFAD2-7	5’-CATGAATGTGGTCATCATGCCTTTAG-3’（配列番号66）	5’-CTTCTTCATCCATTCGGTTTGC-3’（配列番号67）
CtFAD2-8	5’-CGTGGTTGAATGACACCATTGGTTAC-3’（配列番号68）	5’-ACCTTCTACACACCGGTATGCCT-3’（配列番号69）
CtFAD2-9	5’-CATGGAAGATAAGCCACCGTCGACATC-3’（配列番号70）	5’-AACACGGGTTCGCTTGAGCACGA-3’（配列番号71）
CtFAD2-10	5’-TGCATACCCGCAAGCAAAACCG-3’（配列番号72）	5’-CCATCTCTCGAGAGTTCCTTAC-3’（配列番号73）
CtFAD2-11	5’-ATGTGGTCACCATGCCTTTAGTGAG-3’（配列番号74）	5’-TGGAATGGTCCTCCATTCCGCTC-3’（配列番号75）

【表３】

ベニバナにおける*ＦＡＤ２*遺伝子の全コード領域の増幅に使用されるオリゴヌクレオチドプライマー

プライマー遺伝子	センス配列	アンチセンス配列
CtFAD2-1	5’-TGAAAGCAAGATGGGAGGAGG-3’（配列番号78）	5’-TCACAACTTTACTTATTCTTGT-3’（配列番号79）
CtFAD2-2	5’-ATTGAACAATGGGTGCAGGC-3’（配列番号80）	5’-CATCATCTTCAAATCTTATTC-3’（配列番号81）
CtFAD2-3	5’-AATCAGCAGCAGCACAAGC-3’（配列番号82）	5’-CAAACATACCACCAAATGCTACT-3’（配列番号83）
CtFAD2-4	5’-CTCAGTAACCAGCCTCAAAACTTG-3’（配列番号84）	5’-GCGGATTGATCAAATACTTGTG-3’（配列番号85）
CtFAD2-5	5’-ATCACAGGAAGCTCAAAGCATCT-3’（配列番号86）	5’-GTAGGTTATGTAACAATCGTG-3’（配列番号87）
CtFAD2-6	5’-TGAAGACGTTAAGATGGGAGCTG-3’（配列番号88）	5’-GTAGGTTATGTAACAATCGTG-3’（配列番号89）
CtFAD2-7	5’-CAGATCCAACACTTCACCACCAG-3’（配列番号90）	5’-AGATCTAAAGAATTTCCATGGTG-3’（配列番号91）
CtFAD2-8	5’-CTGCTCTCTACGACACTAAATTCAC-3’（配列番号92）	5’-TCTATCTAATGAGTATCAAGGAAC-3’（配列番号93）
CtFAD2-9	5’-CTGAATTCACACCCACAGATAGCTAG-3’（配列番号94）	5’-ACATCCCTTCTTAGCTTTAACTA-3’（配列番号95）
CtFAD2-10	5’-ACTTCGCCCTCTGTTATCTGG-3’（配列番号96）	5’-CCATACACATACATCCTACACGAT-3’（配列番号97）
CtFAD2-11	5’-ACTCACAATAACTTCATCTCTCTC-3’（配列番号98）	5’-CTACTAGCCATACAATGTCTTCG-3’（配列番号99）

【表４】

ベニバナ由来の候補*ＦＡＤ２*　ｃＤＮＡの特徴

遺伝子の表示	cDNA長さ(nt)	タンパク質コード領域	5’UTRの大きさ	3’UTRの大きさ	イントロンの位置	イントロンの大きさ	ORFヌクレオチド配列番号
CtFAD2-1	1422	124-1266	123	156	-13	1144	12
CtFAD2-2	1486	81-1233	80	253	-12	3090	13
CtFAD2-3	1333	51-1197	50	136	-11	114	14
CtFAD2-4	1403	52-1227	51	176	-11	124	15
CtFAD2-5	1380	66-1194	65	186	-33	122	16
CtFAD2-6	1263	15-1146	14	117	*	*	17
CtFAD2-7	1375	66-1185	65	190	-29	253	18
CtFAD2-8	1345	58-1207	57	138	*	*	19
CtFAD2-9	1326	108-1172	107	154	*	*	20
CtFAD2-10	1358	56-1199	55	159	-38	2247	21
CtFAD2-11	1229	58-1092	57	137	-22	104	22

【表５】

候補ＣｔＦＡＤ２ポリペプチドの特徴

遺伝子の表示	ポリペプチドの長さ（アミノ酸の数）	第１のHisボックスの位置（および配列）	第２のHisボックスの位置（および配列）	第３のHisボックスの位置（および配列）	アミノ酸配列番号
CtFAD2-1	380	105 HECGH*	141 HRRHH	315 HVVHH	27
CtFAD2-2	384	106 HECGH	142 HRRHH	316 HVTHH	28
CtFAD2-3	381	104 HECGH	140 HRTHH	314 HAVHH	29
CtFAD2-4	380	103 HECGH	139 HRTHH	313 HAVHH	30
CtFAD2-5	375	102 HDCGH	138 HRTHH	311 HVVHH	31
CtFAD2-6	376	101 HDLGH	137 HRSHH	310 HVVHH	32
CtFAD2-7	372	99 HECGH	135 HRTHH	308 HAVHH	33
CtFAD2-8	382	103 HECGH	139 HRTHH	313 HAVHH	34
CtFAD2-9	387	107 HECGH	143 HRTHH	318 HAVHH	35
CtFAD2-10	380	104 HECGH	140 HRRHH	314 HVVHH	36
CtFAD2-11	377	100 HECGH	136 HRNHH	310 HVLHH	37

＊ＨＥＣＧＨ（配列番号１５９）、ＨＤＣＧＨ（配列番号１６０）、ＨＤＬＧＨ（配列番号１６１）、ＨＲＲＨＨ（配列番号１６２）、ＨＲＴＨＨ（配列番号１６３）、ＨＲＳＨＨ（配列番号１６４）、ＨＲＮＨＨ（配列番号１６５）、ＨＶＶＨＨ（配列番号１６６）、ＨＶＴＨＨ（配列番号１６７）、ＨＡＶＨＨ（配列番号１６８）、およびＨＶＬＨＨ（配列番号１６９）。

【０３４２】

ベニバナ候補ＦＡＤ２ポリペプチドの既知のＦＡＤ２酵素との関係を調べるために、１１の推定ポリペプチド配列を、植物ＦＡＤ２配列と整列させ、近接結合樹を、ベクターＮＴＩを使用して構築した（図１）。図１に示されるように、ＣｔＦＡＤ２－１およびＣｔＦＡＤ２－１０のアミノ酸配列は、まず第一に、互いに、次いで、他の種由来の種子を発現したＦＡＤ２と最も密接に関係した。ＣｔＦＡＤ２－２は、ベニバナにおいて、他の候補ＦＡＤ２よりも他の種由来の構造的に発現した遺伝子とより密接に関係した。ＣｔＦＡＤ２－３、－４、－５、－６、および－７は、近接結合樹において新しい枝を形成し、ベニバナにおいて増倍する最近分岐した遺伝子の進化の結果としての可能性が最も高い。興味深いことに、他種への同系性に関して、これらは、カレンデュラオフィキナリス（Ｃａｌｅｎｄｕｌａ　ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ）由来の機能的に分岐したＦＡＤ２コンジュガーゼと最も密接に関係した。ＦＡＤ２－１１は、真菌性誘導物質によって誘導されたヒマワリｖＦＡＤ２を含む、いくつかの植物種由来のアセチレナーゼとより密接に関係した（Ｃａｈｏｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００３）。ＣｔＦＡＤ２－８および－９は、ベニバナ由来の他の候補ＦＡＤ２よりもさらに分岐したと思われた。しかしながら、この分析はまた、配列比較が可能な機能についていくつかの手がかりを与えたが、それ自体、異なるＦＡＤ２候補の機能について信頼できる結論を提供し得なかったことも示した。したがって、機能分析は、それぞれの

115

遺伝子／ポリペプチドの機能について結論を出すのに必要とされた。

【０３４３】

配列比較は、ベニバナ候補ＦＡＤ２ポリペプチドが他の種由来の既知のＦＡＤ２酵素と約５０％～６０％の配列同一性、および５２％～６５％の類似性を共有することを示した。ベニバナＣｔＦＡＤ２遺伝子の間でのＤＮＡ配列分散の範囲は、ＣｔＦＡＤ２－３、－４、および－５がすべて、ＣｔＦＡＤ２－１、またはＣｔＦＡＤ２－１０よりも互いにより類似し、逆もまた同様であるという点において、それらの系統発生関係に反映した。。これらの数は、アミノ酸の同一性マトリックスにおいて緊密な一致を有する（表６）。

【表６】

ベニバナ*ＦＡＤ２*遺伝子におけるコード領域ＤＮＡおよび推定されたアミノ酸の配列同一性

	推定されたアミノ酸同一性（%）										
	CtFAD2 −1	CtFAD2 −2	CtFAD2 −3	CtFAD2 −4	CtFAD2 −5	CtFAD2 −6	CtFAD2 −7	CtFAD2 −8	CtFAD2 −9	CtFAD2 −10	CtFAD2 −11
CtFAD2 −1	−	70.3	53.2	52.5	53.5	50.9	54.1	59.7	59.5	80.1	56.4
CtFAD2 −2	70.0	−	54.5	55.0	54.2	51.7	57.8	60.6	62.5	69.5	58.6
CtFAD2 −3	62.0	62.0	−	97.1	62.0	61.8	63.1	52.7	50.9	51.2	56.8
CtFAD2 −4	62.7	63.3	95.1	−	61.4	61.4	63.3	53.1	50.9	50.9	56.9
CtFAD2 −5	61.9	60.3	69.7	70.6	−	63.2	62.0	51.4	51.3	51.7	53.9
CtFAD2 −6	60.6	59.9	68.8	69.6	72.0	−	63.1	49.3	50.8	50.1	56.2
CtFAD2 −7	62.2	65.8	69.4	69.3	66.6	68.2	−	51.7	49.2	51.4	60.7
CtFAD2 −8	65.2	66.2	63.1	62.8	60.8	61.7	61.2	−	58.8	58.1	56.40
CtFAD2 −9	64.9	66.2	59.5	59.5	58.3	59.2	59.5	63.5	−	59.3	55.9
CtFAD2 −10	78.9	72.0	60.7	62.0	59.8	61.0	60.7	64.3	64.1	−	57.2
CtFAD2 −11	60.0	62.9	64.1	64.4	62.4	64.1	62.7	63.9	60.9	61.7	−

【０３４４】

候補ＣｔＦＡＤ２ポリペプチドの特徴

１１の候補ＣｔＦＡＤ２の予測されたポリペプチドはそれぞれ、Ｃ末端の最末端で芳香族アミノ酸リッチなモチーフを含有した。そのようなモチーフは、他の植物ＦＡＤ２ポリペプチドにおいて特定されており、ＥＲにおいて局在性を維持するために必要であると考えられる（ＭｃＣａｒｔｎｅｙ ｅｔ ａｌ．，２００４）。他の植物膜結合型脂肪酸デサチュラーゼ酵素と一致して、予測されたＣｔＦＡＤ２ポリペプチドはそれぞれ、３つのヒスチジンリッチなモチーフ（Ｈｉｓボックス）を含有した。そのようなＨｉｓリッチモチーフは、ＦＡＤ２酵素において高度に保存され、生化学的触媒作用において使用される酸化二鉄複合体の形成に関与することが示されている（Ｓｈａｎｋｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，１９９８）。ほとんどの候補ＣｔＦＡＤ２ポリペプチド配列において、第一のヒスチジンモチーフは、ＨＥＣＧＨＨであり、例外は、それぞれ、ＨＤＣＧＨＨおよびＨＤＬＧＨＨを有するＣｔＦＡＤ２－５および－６であった。ＣｔＦＡＤ２－８における第１のＨｉｓボックスの最後のアミノ酸（ＨＥＣＧＨＱ）は、Ｈよりはむしろ Ｑであった。本発明者らは、５５の既知の植物ＦＡＤ２酵素において

116

このモチーフを探し求め、また、ＨからＱへの変換も、主に脂肪酸ヒドロキシラーゼ活性を有するＬｅｓｑｕｅｒｅｌｌａ ｌｉｎｄｈｅｉｍｅｒｉ由来の分岐したＦＡＤ２同族体に存在する（Ｇｅｎｂａｎｋアクセッション番号ＥＦ４３２２４６、Ｄａｕｋ ｅｔ ａｌ．，２００７）。第２のヒスチジンモチーフは、ＣｔＦＡＤ２－１、－２、－８、－９、および－１０を含むいくつかの候補ベニバナＦＡＤ２において、アミノ酸配列ＨＲＲＨＨとして高度に保存された。アミノ酸Ｎが、モチーフの＋３位でＣｔＦＡＤ２－１１に見出され、クレピスアルピナ（Ｃｒｅｐｉｓ ａｌｐｉｎａ）ＣＲＥＰ１、クレピスパラエスチナ（Ｃｒｅｐｉｓ ｐａｌａｅｓｔｉｎａ）Ｃｐａｌ２、およびヒマワリｖＦＡＤ２（ＡＹ１６６７７３．１）、カレンデュラオフィキナリスＦＡＣ２（ＡＦ３４３０６４．１）、ルドベッキアヒルタ（Ｒｕｄｂｅｃｋｉａ ｈｉｒｔａ）アセチレナーゼ（ＡＹ１６６７７６．１）を含む、多数の機能的に分岐したＦＡＤ２型酵素にも見出されたことは注目に値した。ＣｔＦＡＤ２－３、－４、－５、－６、および－７におけるこの位置でのアミノ酸は、ＳまたはＴのいずれかであった。

【０３４５】

ＣｔＦＡＤ２－１、－２、－９、および－１０ポリペプチドのそれぞれにおいて、第１のヒスチジンボックスに直接先行するアミノ酸は、他の植物脂肪酸Δ１２－デサチュラーゼ酵素に対するものと同じであるアラニンであった。アラニンではなくてアミノ酸バリン（Ｖ）が、ＣｔＦＡＤ２－５におけるその位置で存在したが、他の６つのＣｔＦＡＤ２ポリペプチドは、この位置でグリシンを有した。この位置でのアラニンのグリシン置換が、脂肪酸Δ１２－ヒドロキシラーゼを除く、機能的に分岐したＦＡＤ２酵素において見出されたことが、Ｃａｈｏｏｎ ｅｔ ａｌ．（２００３）によって提案された。以下の実施例に記載されるように、候補の機能を試験するその後の異種発現実験は、ＣｔＦＡＤ２－１、－２、および－１０ポリペプチドのそれぞれが、オレイン酸塩Δ１２－デサチュラーゼであったことを示したが、ＣｔＦＡＤ２－９は、オレイン酸塩ではなくパルミトレイン酸塩（Ｃ１６：１）へのデサチュラーゼ特異性を示した。

【０３４６】

１１の候補ＣｔＦＡＤ２のうちのＣｔＦＡＤ２－１１ポリペプチドのみが、すべての植物アセチレナーゼに生じることを提案する（Ｄ／Ｎ）ＶＸ（Ｈ／Ｎ）モチーフと一致する第３のヒスチジンボックスの－５から－２位置においてＤＶＴＨ配列を有することを意味した（Ｂｌａｃｋｌｏｃｋ ｅｔ ａｌ．，２０１０）。他の既知の植物ＦＡＤ２オレイン酸塩デサチュラーゼに関しては、ＣｔＦＡＤ２－１、－２、および－１０ポリペプチドの第３のヒスチジンボックスの直後の５つのアミノ酸は、ＬＦＳＴＭであった。対照的に、パルミトレイン酸塩に

117

特異的な脂肪酸デサチュラーゼＣｔＦＡＤ２－９は、＋４および＋５位で２つのアミノ酸置換を有するこの位置でＬＦＳＹＩモチーフを有した。ＣｔＦＡＤ２－３、－４、および－５ポリペプチドにおいて、Ｓは、＋３位で、カレンデュラオフィキナリス（ＦＡＣ２、アクセッションＡＡＫ２６６３２）およびトリコサンテスキリロイ（Ｔｒｉｃｈｏｓａｎｔｈｅｓ　ｋｉｒｉｌｏｗｉｉ）（アクセッションＡＡＯ３７７５１）由来のものを含む他のＦＡＤ２脂肪酸コンジュガーゼにおいてのみに存在するＰで置換された。

【０３４７】

大豆ＦＡＤ２－１酵素のセリン－１８５は、その酵素活性のための調節機構として、種子の発育時にリン酸化されることが示されている（Ｔａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００５）。１１の候補ＣｔＦＡＤ２ポリペプチドのうちでＣｔＦＡＤ２－１のみが、大豆ＦＡＤ２－１に対して、対応する位置にセリン（セリン－１８１）を有した。発育中の種子中のミクロソームΔ１２オレイン酸塩の不飽和化を調節するために、同じ翻訳後調節機構が、セリン－１８５のリン酸化反応を通じて、ベニバナ種子の発育および油蓄積時に動作することが結論付けられた。

【０３４８】

実施例３．ＦＡＤ２候補のためのゲノム配列の単離

候補ＣｔＦＡＤ２遺伝子の５’ＵＴＲイントロンの単離

ＦＡＤ２遺伝子のイントロン－エクソン構造は、多くの開花植物において保存されている。第１のＡＴＧ翻訳開始コドンの直後に、大豆ＦＡＤ２－１のイントロンがコード領域に位置する１つの例外はあるが、研究されたすべてのＦＡＤ２遺伝子は、これまでのところ、５’ＵＴＲで位置される１つのイントロンのみを含有する（Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，２００１、Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．，２００６、Ｍｒｏｃｚｋａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０）。イントロン配列の分岐は、分類学的に密接に関係した種間の進化の尺度として使用され得る（Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，２００１）。

【０３４９】

候補ＣｔＦＡＤ２遺伝子の５’－ＵＴＲ内に位置している可能なイントロンのＤＮＡ配列を単離するために、典型的なイントロンスプライス部位（ＡＧ：ＧＴ）がそれぞれのＣｔＦＡＤ２　ｃＤＮＡ配列の５’ＵＴＲにおいて予測され、ＰＣＲプライマーが予測されたスプライス部位のフランキング配列に基づいて設計された。これらのプライマーを表７中に列記する。ベニバナ遺伝子型ＳＵから単離されたゲノムＤＮＡは、５’ＵＴＲに対応するゲノム領域を増幅するために、ＰＣＲ反応物の鋳型として使用された。増幅は、１００ｎｇのゲノムＤＮＡ、２０ｐｍｏｌのそれぞれのプライマー、および製造業者によって供給されたＨｏｔｓｔａｒ（Ｑｉａｇｅｎ，Ｈｉｌｄｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を含む５０μＬの反応物において達成された。ＰＣＲ温度サイクルは、Ｋｙｒａｔｅｃ　ｓｕｐｅｒｃｙｃｌｅｒ　ＳＣ２００（Ｋｙｒａｔｅｃ，Ｑｕｅｅｎｓｌａｎｄ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）を使用して、９４℃で１５分間を１サイクル、９４℃で３０秒間、５５℃で１分間、７２℃で２分間を３５サイクル、７２℃で１０分間、行われた。ＰＣＲ生成物を、ｐＧＥＭ－Ｔ　Ｅａｓｙにクローン化して、次いで、配列決定された。

118

【０３５０】

本発明者らは、ＣｔＦＡＤ２－１、－２、－３、－４、－５、－７、－１０、および－１１と命名された、１１つの候補ＣｔＦＡＤ２遺伝子のうちの８つからの予測された５’イントロンを得ることができた。これらのイントロンの主な特徴を表８中に示す。恐らくは、イントロンが存在した不十分な長さの５’ＵＴＲにより、このイントロンは、ＣｔＦＡＤ２－６、－８、および－９からは首尾よく増幅されなかった。高等植物において、核遺伝子からのイントロン欠失が通常観察されるが、イントロンの少ないＦＡＤ２は、報告されなかったと思われた（Ｌｏｇｕｅｒｃｉｏ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８、Ｓｍａｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，２０００ａ；ｂ）。

【表７】

ベニバナにおける候補*ＦＡＤ２*遺伝子の５’ＵＴＲ領域の増幅に使用されるオリゴヌクレオチドプライマー

プライマー遺伝子	センス配列	アンチセンス配列
CtFAD2-1	5’－GAGATTTTCAGAGAGCAAGCGCTT－3’（配列番号100）	5’－CTTTGGTCTCGGAGGCAGACATA－3’（配列番号101）
CtFAD2-2	5’－CAAAAGGAGTTTCAGAAAGCCTCC－3’（配列番号102）	5’－ACTCGTTGGATGCCTTCGAGTTC－3’（配列番号103）
CtFAD2-3	5’－AATCAGCAGCAGCACAAGC－3’（配列番号104）	5’－AAGGCGGTGACAATTATGATATC－3’（配列番号105）
CtFAD2-4	5’－CTCAGTAACCAGCCTCAAAACTTG－3’（配列番号106）	5’－AAGGCGGAGACGATTATGATATC－3’（配列番号107）
CtFAD2-5	5’－ATCACAGGAAGCTCAAAGCATCT－3’（配列番号108）	5’－ATCATCTCTTCGGTAGGTTATG－3’（配列番号109）
CtFAD2-7	5’－CAGATCCAACACTTCACCACCAG－3’（配列番号110）	5’－CTAAAGAATTTCCATGGTGTTAC－3’（配列番号111）
CtFAD2-10	5’－ACTTCGCCCTCTGTTATCTGG－3’（配列番号112）	5’－GAGAGACGGTGGAAGTAGGTG－3’（配列番号113）
CtFAD2-11	5’－CTCACAATAACTTCATCTCTCTC－3’（配列番号114）	5’－AAAGACATAGGCAACAACGAGATC－3’（配列番号115）

【表８】

119

候補*FAD2*遺伝子イントロンの特徴

特徴	CtFAD2-1	CtFAD2-2	CtFAD2-3	CtFAD2-4	CtFAD2-5	CtFAD2-7	CtFAD2-10	CtFAD2-11
位置	-13	-12	-11	-11	-33	-29	-38	-22
長さ	1144	3090	114	124	122	253	2247	104
AT含量	64.5%	65.8%	73.7%	75.0%	67.2 %	62.1%	68.9%	75%
CG含量	35.5%	34.2%	26.3%	25.0%	32.8%	37.9%	31.1%	25%
5' E/I境界	AG:GTGCAT	AG:GTGAGA	AG:GTATGA	AG:GTAAGT	AG:GTGAAG	AG:GTATAC	TG:GTTCGT	AG:GTTTCT
3' I/E境界	TTGCAG:GT	TTGCAG:GT	ATGCAG:GT	GCGCAG:GT	TTTCAG:GT	TTGCAG:GT	ATATAG:GT	TTGCAG:GT

【０３５１】

８つの遺伝子のそれぞれのイントロン配列は、それぞれのオープンリーディングフレーム中の第１のＡＴＧの推定上の翻訳開始コドンの上流１１～３８ｂｐの範囲に及ぶ位置で、それぞれの遺伝子の５’－ＵＴＲ内に位置した。イントロン長は、１０４ｂｐ（ＣｔＦＡＤ２－１１）～３，０９０ｂｐ（ＣｔＦＡＤ２－２）の範囲に及んだ（表８）。ＣｔＦＡＤ２－１については、イントロンの大きさは、アラビドプシス（Ｔｈｅ　Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅ，ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ．ｏｒｇ）、綿実（Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，２００１）、およびゴマ（Ｓｅｓａｍｕｍ　ｉｎｄｉｃｕｍ）由来のＦＡＤ２遺伝子において特定されたイントロンと同様の大きさの１，１４４ｂｐであった（Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．，２００６）。推定上のスプライス部位のジヌクレオチドＡＧおよびＧＴは、検査されたＣｔＦＡＤ２遺伝子の８つすべてで保存されたが、そうでなければ、イントロン配列はすべて、それらの間にいかなる有意な相同性も有さない配列において分岐された。イントロン配列はすべて、６１％～７５％のＡ／Ｔ含量を有するＡ／Ｔリッチであり、双子葉植物由来の多くの他のイントロン配列と一致した。他の双子葉植物由来の遺伝子において、アラビドプシスＦＡＤ２遺伝子は、そのＡＴＧ翻訳開始コドンからわずかに５ｂｐ上流の１，１３４ｂｐイントロンを有した。ゴシッピウムヒルスツムＦＡＤ２－１遺伝子の５’－ＵＴＲイントロンの大きさは、１，１３３ｂｐであり、翻訳開始コドンから９ｂｐ上流に位置した。対照的に、綿実ＦＡＤ２－４およびＦＡＤ２－３遺伝子はそれぞれ、２，７８０ｂｐおよび２，９６７ｂｐのより大きな５’－ＵＴＲイントロンを有し、翻訳開始コドンから１２ｂｐ上流に位置した。それぞれの候補ＣｔＦＡＤ２遺伝子は、それぞれの遺伝子において、５’－ＵＴＲイントロンの位置および大きさの違いによって区別され得る。この違いはまた、遺伝子の差次的発現を提供する際に重要であり得る。そのようなイントロンは、ゴマにおけるレポーター遺伝子の発現において好ましい効果を有することが報告されている（Ｋｉｍｅｔ　ａｌ．，２００６）。対応するイントロンは、大豆において、ＦＡＤ２の翻訳後遺伝子サイレンシングに対して有効な標的であることが示された（Ｍｒｏｃｚｋａ　ｅｔａｌ．，２０１０）。

【０３５２】

イントロンは、遺伝子発現プロファイルにおいて劇的な効果を有し得ることが知られている。ＰＬＡＣＥプログラム（ｗｗｗ．ｄｎａ．ａｆｆｒｃ．ｇｏ．ｊｐ／ＰＬＡＣＥ／）によるイントロン配列の分析により、いくつかの推定上のシス調節要素を特定した。例えば、種子特異的なプロモーターに通常存在する、ＡＢＲＥおよびＳＥＦ４等のモチーフは、ＣｔＦＡＤ２－１に位置している。損傷または誘導物質による処理等の様々な応力によって誘導された防御関連遺伝子のプロモーターに通常見出されるＡＧモチーフは、ベニバナの若い実生の胚軸および双子葉において特異的に発現されるＣｔＦＡＤ２－３で位置した。

【０３５３】

実施例４．候補ベニバナＦＡＤ２遺伝子のサザンブロットハイブリダイゼーション分析

ベニバナにおいて、ＦＡＤ２様遺伝子ファミリーの複雑性を、サザンブロットハイブリダイゼーション分析によって試験した。低ストリンジェンシーなハイブリダイゼーション分析は、ベニバナにおいて、ＦＡＤ２が複合多重遺伝子ファミリーによってコードされたことを示した（図２）。ゲノムＤＮＡを切断する様々制限酵素を使用することによって得られたハイブリダイズする断片を計数することによって、ベニバナにおいて、１０を超えるＦＡＤ２またはＦＡＤ２様遺伝子があったことが推測された。異なる断片に対してハイブリダイゼーションの強度に見られる差異は、恐らくは、配列同一性の相対的レベルと使用されたプローブＤＮＡとの相関性がある。ベニバナは、２倍体種であり、単一の野生子孫種Ｃ．パラエスチヌス（ｐａｌａｅｓｔｉｎｕｓ）を有すると考えられる（Ｃｈａｐｍａｎ　ａｎｄ　Ｂｕｒｋｅ，２００７）。本発明者らは、ベニバナにおける異常に大きいＦＡＤ２遺伝子ファミリーが、恐らく、いくつかの古代遺伝子の複製由来であり、遺伝子ファミリーの異なるメンバーの特殊化および特異的な活性をもたらすと推測する

121

。

【０３５４】

実施例５．酵母および植物細胞における候補遺伝子の機能的分析

酵母における候補ＣｔＦＡＤ２遺伝子の発現－機能的分析

都合の良い宿主細胞として、いくつかの植物ＦＡＤ２Δ１２オレイン酸塩脂肪酸デサチュラーゼの機能的発現を研究するために、酵母Ｓ．セレヴィシエが、使用されている（Ｃｏｖｅｌｌｏ ａｎｄ Ｒｅｅｄ １９９６、Ｄｙｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００２、Ｈｅｒｎａｎｄｅｚ ｅｔ ａｌ．，２００５）。Ｓ．セレヴィシエは、比較的に単純な脂肪酸プロファイルを有し、ＦＡＤ２酵素の基質として使用することができるそのリン脂質内に十分なオレイン酸を含有する。それはまた、内因性ＦＡＤ２活性を欠いている。したがって、実施例１に記載されるように、１１の候補ＣｔＦＡＤ２遺伝子を、ｐＹＥＳ２由来の構築物、ＧＡＬ１プロモーターの制御下でそれぞれのオープンリーディングフレームを使用して、酵母株ＹＰＨ４９９において試験した。

【０３５５】

図３に示されるように、「空ベクター」ｐＹＥＳ２を含む酵母細胞の脂肪酸組成物を分析した場合、酵母が内因性ＦＡＤ２を欠いているため、予測されたように、リノール酸（１８：２）もヘキサデカジエン酸（１６：２）も検出されなかった。対照的に、ＣｔＦＡＤ２－１、ＣｔＦＡＤ２－２、およびＣｔＦＡＤ２－１０のオープンリーディングフレームを発現する酵母細胞から得られた脂肪酸のガスクロマトグラムはそれぞれ、リノール酸（Ｃ１８：２）に対応する１１．２９３分間の保持時間を有する脂肪酸ピークを示し、ＣｔＦＡＤ２－９およびＣｔＦＡＤ２－１０に対するガスクロマトグラムは、Ｃ１６：２に対応する８．５１３分間の保持時間を有する脂肪酸ピークを示した。これらのデータは、ＣｔＦＡＤ２－１、ＣｔＦＡＤ２－２、およびＣｔＦＡＤ２－１０がオレイン酸をリノール酸に変換することができ、したがって、Δ１２オレイン酸塩デサチュラーゼであったことを示した。しかしながら、生成された１８：２のレベルは、陽性対照として使用されたアラビドプシスＡｔＦＡＤ２構築物に対するものよりも低かった。ＣｔＦＡＤ２－１０は、基質として、それぞれ、オレイン酸（Ｃ１８：１）およびパルミトレイン酸（Ｃ１６：１）を使用して、リノール酸（Ｃ１８：２）およびヘキサデカジエン酸（Ｃ１６：２）の両方を生成したが、ＣｔＦＡＤ２－９は、パルミトレイン酸を不飽和化し、したがって、Δ１２パルミトレイン酸塩デサチュラーゼであった。ＣｔＦＡＤ２－１１を発現する酵母細胞由来のＦＡＭＥのクロマトグラムに現れる２つの新しい微小ピークは、それらのピロリジド付加物、およびＤＭＯＸのＧＣ－ＭＳによって、リノール酸（１８：$2^{\Delta 9(Z),12(Z)}$）およびそのトランス異性体（１８：$2^{\Delta 9(Z),12(E)}$）として特定された（図３Ｈ）。表９は、ＣｔＦＡＤ２コード領域を発現する酵母細胞の脂肪酸組成物を要約する。ＣｔＦＡＤ２－３、－４、－５、－６、－７、および－８を発現する酵母細胞において、新しいピークは検出されなかった。

122

【０３５６】

候補ＣｔＦＡＤ２ポリペプチドのうちのいずれかが、脂肪酸ヒドロキシラーゼ活性を有するかどうかを試験するために、ＣｔＦＡＤ２のオープンリーディングフレームのそれぞれを発現する酵母細胞から調製されたＦＡＭＥを、ヒドロキシル残基をＴＭＳ－エーテル誘導体に変換するシリル化試薬と反応させ、質量スペクトルを試験し得た。しかしながら、オレイン酸等の一般的な脂肪酸のヒドリキシル誘導体は、候補ＣｔＦＡＤ２のオープンリーディングフレームを発現する酵母細胞株のいずれにおいても検出されなかった。これは、１１のＣｔＦＡＤ２遺伝子のいずれも、酵母において、脂肪酸ヒドロキシラーゼ活性を有するポリペプチドをコードしなかったことを示す。

【０３５７】

遊離リノール酸を有する同じ酵母細胞株の生育培地を補充し、その後、脂肪酸組成物を分析することによって、Δ１２－エポキシゲナーゼおよびΔ１２－アセチレナーゼの活性（両方とも脂肪酸基質としてリノール酸を使用する）を検出するために、さらなる実験が行われた。構築物を発現させるために、培地にガラクトーゼを添加した後に、補充を行った。ガスクロマトグラムにおいて、エポキシおよびアセチレン脂肪酸誘導体を表すものを含む、新規の脂肪酸ピークは、検出されなかった。外因性遊離脂肪酸の補充を伴う、酵母におけるこれらの新規の脂肪酸の異種発現は、活性を示す際にいくつかの困難に遭っている（Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，１９９８、Ｃａｈｏｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００３）。したがって、植物細胞における機能的分析が以下の通りに行われた。

【表９】

123

選択されたＣｔＦＡＤ２遺伝子を発現する酵母細胞の脂肪酸組成

	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C16:2	C18:0	C18:1	$C18:1^{\Delta 11}$	C18:2	$C18:2^{\Delta 9,12E}$
ベクター	1.30 ± 0.15	0.31 ± 0.06	23.62 ± 1.82	36.04 ± 1.77		7.69 ± 0.74	29.62 ± 0.99	1.42 ± 0.20		
CtFAD2-1	1.17 ± 0.02	0.31 ± 0.01	22.96 ± 0.04	37.15 ± 0.16	0.28 ± 0.02	7.37 ± 0.12	26.36 ± 0.24	1.57 ± 0.02	2.82 ± 0.14	
CtFAD2-2	1.17 ± 0.06	0.29 ± 0.01	22.02 ± 0.46	36.60 ± 0.07		7.38 ± 0.07	30.95 ± 0.51	1.48 ± 0.04	0.11 ± 0.01	
CtFAD2-9	1.13 ± 0.06	0.18 ± 0.01	21.30 ± 0.59	34.32 ± 0.54	1.61 ± 0.09	8.90 ± 0.13	31.29 ± 0.25	1.27 ± 0.08		
CtFAD2-10	1.04 ± 0.01	0.27 ± 0.02	22.31 ± 0.03	34.79 ± 0.21	1.23 ± 0.03	8.08 ± 0.09	25.43 ± 0.07	1.34 ± 0.01	5.49 ± 0.09	
CtFAD2-11	0.63 ± 0.01	0.17 ± 0.00	18.41 ± 0.34	37.27 ± 0.16		7.52 ± 0.07	33.25 ± 0.26	1.91 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.51 ± 0.03
(n=3)										

【０３５８】

Ｎ．ベンタミアーナにおける候補ＣｔＦＡＤ２遺伝子の一過性発現

植物細胞において、具体的には、植物葉において構造的様式で遺伝子を発現するために、ＣｔＦＡＤ２　ＯＲＦのそれぞれを、増強されたＣａＭＶ－３５Ｓプロモーターとポリアデニル化シグナル配列を含むｎｏｓ３’ターミネーターとの間の修飾されたｐＯＲＥ０４バイナリーベクター中にセンス方向に挿入した（Ｃｏｕｔｕ　ｅｔ　ａｌ．，２００７）（配列番号５４）。先行研究は、導入遺伝子の発現がウイルスサイレンシングサプレッサータンパク質Ｐ１９の共発現によって有意に増強され、Ｎ．ベンタミアーナ葉に基づいた一過性アッセイにおいて、宿主導入遺伝子サイレンシングを誘導したことを示した（Ｖｏｉｎｎｅｔ　ｅｔ　ａｌ．，２００３、Ｗｏｏｄ　ｅｔ　ａｌ．，２００９、Ｐｅｔｒｉｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０）。実施例１に記載されるように、これらの実験を行った。

【０３５９】

上述のように、ＣｔＦＡＤ２－１１の機能は、初めに、Ｓ．セレヴィシエにおける発現によって評価され、２つの新規の脂肪酸はそれぞれ、ＧＣ－ＭＳにより１８：２$^{\Delta 9(Z),12(Z)}$および１８：２$^{\Delta 9(Z),12(E)}$として特定された。酵母菌から得られた結果と一致して、Ｎ．ベンアミアーナ葉におけるＣｔＦＡＤ２

124

－１１の発現により、新規の１８：２トランス異性体を得た。この異性体のメチルエステルは、メチル１８：２$^{\Delta 9(Z),12(E)}$のＧＣ保持時間と同一のＧＣ保持時間を示した（図４Ｂ）。新規の１８：２$^{\Delta 9(Z),12(E)}$は、ＣｔＦＡＤ２－１１を一過的に発現した後の葉において脂肪酸の０．３５％を占めた（表１０）。さらに、酵母培地中で観察されなかった別の新しいピークが検出された。この新しい脂肪酸の全イオンクロマトグラムおよび質量スペクトルは、クレペニン酸（１８：２$^{\Delta 9(Z),12(c)}$）のものと一致し（図４ＢおよびＣ）、これは、ＣｔＦＡＤ２－１１ポリペプチドがΔ１２－アセチレナーゼ活性を有したことを示す。表１０中に示されるように、クレペニン酸は、全脂肪酸の０．５１％を占めた。

【０３６０】

Ｎ．ベンアミアーナ細胞中のＣｔＦＡＤ２－１１の一過的な発現が、非形質転換対照と比較して、１８：２$^{\Delta 9(Z),12(Z)}$の含量の減少をもたらしたことが観察された（表１０）。これは、両酵素の基質のオレイン酸の利用可能なプールにおける、Ｎ．ベンアミアーナ細胞中のＣｔＦＡＤ２－１１と内因性シス－Δ１２オレイン酸塩デサチュラーゼとの競合による可能性が高かった。概して、酵母菌およびＮ．ベンアミアーナ発現実験の結果は、ＣｔＦＡＤ２－１１がリノール酸およびそのトランス－Δ１２異性体の両方を生じるステレオ特異性を欠いているオレイン酸塩Δ１２－デサチュラーゼとして主に機能したことを示した。さらに、Δ１２二重結合のリノール酸をさらに非飽和して、クレペニン酸のアセチレン結合を形成し得た。

【０３６１】

また、その他の１０の候補ＣｔＦＡＤ２ポリペプチドは、同じ方法でＮ．ベンアミアーナ葉において一過的に発現したが、既に高レベルのＦＡＤ２を有するＮ．ベンアミアーナ葉において内因的に存在しない、いかなる新しい脂肪酸も観察しなかった。

【表１０】

125

ＣｔＦＡＤ２－１１を一過的に発現するＮ．ベンアミアーナ葉の脂肪酸組成

	C16:0	C16:1	C16:2	C16:3	C18:0	C18:1	C18:1$^{\Delta 11}$	C18:2$^{\Delta 9,12E}$	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C18:2$^{\Delta 6}$
対照	17.42± 0.48	0.25± 0.02	0.03± 0.12	7.24± 0.15	3.32± 0.33	1.02± 0.09	0.46± 0.03		12.03± 0.65	56.79± 0.19	0.49± 0.10	0.18± 0.15	
CtFAD2-11	29.70± 2.57	0.28± 0.06	0.82± 0.09	5.50± 0.81	5.50± 0.72	3.82± 0.30	1.15± 0.36	0.35± 0.07	11.63± 0.84	45.78± 4.01	0.95± 0.19	0.41± 0.04	0.51± 0.06
(n=3)													

【０３６２】

考察

ベニバナにおいて特定された上述の１１の候補ＣｔＦＡＤ２遺伝子は、今まで試験されたあらゆる植物種に観察された最大のＦＡＤ２遺伝子ファミリーを表す。単一のＦＡＤ２遺伝子のみがアラビドプシス（Ｏｋｕｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，１９９４）において特定されたが、ＦＡＤ２は、今までに研究されたほとんどの他の植物ゲノムにおいて同義遺伝子によってコードされるように思われる。２つの別個のＦＡＤ２遺伝子が、大豆（Ｈｅｐｐａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，１９９６）、亜麻（Ｆｏｆａｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２００４、Ｋｈａｄａｋｅ　ｅｔ　ａｌ．，２００９）、およびオリーブ（Ｈｅｒｎａｎｚｅ　ｅｔ　ａｌ．，２００５）、ヒマワリにおける３つの遺伝子（Ｍａｒｔｉｎｅｚ－Ｒｉｖａｓ　ｅｔ　ａｌ．，２００１）およびカメリナサティバ（Ｋａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１）、綿実における５つの遺伝子（Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８）において記載されている。アンフィテトラプロイド（ａｍｐｈｉｔｅｔｒａｐｌｏｉｄ）種のブラシカナプスにおいて、４～６つの異なるＦＡＤ２遺伝子が、それぞれの２倍体のサブゲノムに特定されている（Ｓｃｈｅｆｆｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７）。候補ＣｔＦＡＤ２遺伝子のすべては、これらの配列がｃＤＮＡから単離されたため、ベニバナ植物において発現された。このことは、実施例６に記載されるように、さらに試験された。

126

【０３６３】

比較可能な研究を欠いているが、ベニバナが、ＦＡＤ２遺伝子ファミリーの進化に関して独特であることは明らかである。ベニバナは、野生２倍体種カルタムスパラエスチヌス（Ｃａｒｔｈａｍｕｓ　ｐａｌａｅｓｔｉｎｕｓ）と最も密接に関係している自家受粉する２倍体植物種であり、広範なゲノム重複または再配置を有することは知られていない（Ｃｈａｐｍａｎ　ａｎｄ　Ｂｕｒｋｅ，２００７）。候補ＦＡＤ２遺伝子がコード領域配列においてイントロンを含有しなかったため、特定された複数のＦＡＤ２　ｃＤＮＡは、代替のスプライシングに起因し得なかった。むしろ、遺伝子重複が、ベニバナにおけるＦＡＤ２ファミリーの複雑性を生じるのに関与する可能性が高かった。系統樹のトポロジーは、遺伝子重複がいくつかの階層レベルで生じ得ることを示した。例えば、ＣｔＦＡＤ２－３、－４、および－５ポリペプチドは、他のベニバナＦＡＤ２配列よりもクレードがあったという点において、他のものとより密接に関係し、より最近の遺伝子重複がこのクレードの出現に関与し得ることを示す。

【０３６４】

実施例６．ベニバナにおけるＦＡＤ２候補遺伝子の発現レベル

異なる組織におけるＦＡＤ２遺伝子の発現プロファイル

様々な候補ＣｔＦＡＤ２遺伝子の組織発現パターンを決定するために、実施例１に記載されるような、ＲＴ－ＰＣＲ分析を行った。総ＲＮＡは、１０　ＤＡＧの高リノール酸遺伝子型ＳＵのベニバナ実生由来の子葉、胚軸、根、および葉組織、ならびに開花植物由来の花組織および発生中の胚から抽出され、これらのアッセイに使用した。分析のために使用されたオリゴヌクレオチドプライマーを表１１に列記する。

【表１１】

127

ベニバナ *FAD 2*遺伝子の発現プロファイル研究におけるＲＴ－ｑＰＣＲのために使用されたオリゴヌクレオチドプライマー

プライマー－遺伝子	センス配列	アンチセンス配列
CtFAD2-1	5’ - GTGTATGTCTGCCTCCGAGA -3’ (配列番号 116)	5’ - GCAAGGTAGTAGAGACGAAG -3’ (配列番号 117)
CtFAD2-2	5’ - GCCTCCAAAGATTCATTCAGGTC - 3’ (配列番号 118)	5’ - CAAGATGGATGCGATGGTAAGG -3’ (配列番号 119)
CtFAD2-3	5’ - ACGTGGCGGTCTCAGGTT -3’ (配列番号 120)	5’ - AGGCGGTGACAATTATGATATC -3’ (配列番号 121)
CtFAD2-4	5’ - AAGGCAGGCCGTGATGCCGAT -3’ (配列番号 122)	5’ - AGTATTTGATCAATCCGCTGG -3’ (配列番号 123)
CtFAD2-5	5’ - CAATACGGTAGAGGCCACACAG -3’ (配列番号 124)	5’ - ATCATCTCTTCGGTAGGTTATG -3’ (配列番号 125)
CtFAD2-6	5’ - GACATGTGCTCAGTGGTGCAT -3’ (配列番号 126)	5’ - GTTGCTAATATCCACACCCTA -3’ (配列番号 127)
CtFAD2-7	5’ - CGAATCACACCACGGGATC -3’ (配列番号 128)	5’ - CTAAAGAATTTCCATGGTGTTAC -3’ (配列番号 129)
CtFAD2-8	5’ - GAGCAACGGAGAGAAGTAACC -3’ (配列番号 130)	5’ - GAGGGATGATAGAAAGAGGTCC -3’ (配列番号 131)
CtFAD2-9	5’ - CATGTGTGGCTGGAGGATTCGA -3’ (配列番号 132)	5’ - GCACCGAGTTTAGCCTTTGTCT -3’ (配列番号 133)
CtFAD2-10	5’ - CCAACAAACAAACCATCTCTCG -3’ (配列番号 134)	5’ - GAGAAGACGGTGGAAGTAGGTG -3’ (配列番号 135)
CtFAD2-11	5’ - CCATTGATCCACCCTTCCACCTTA -3’ (配列番号 136)	5’ - AAAGACATAGGCAACAACGAGATC -3’ (配列番号 137)
KASII	5’ - CTGAACTGCAATTATCTAGG -3’ (配列番号 138)	5’ - GGTATTGGTATTGGATGGGCG -3’ (配列番号 139)

【０３６５】

１１のＣｔＦＡＤ２遺伝子の時間的および空間的発現を図５に示す。ＲＴ－ｑＰＣＲアッセイは、ＣｔＦＡＤ２－１のみが発育中の種子において発現したことを示した。対照的に、ＣｔＦＡＤ２－２は、試験した他の組織と同様に、種子において低レベルで発現された。さらに、ＣｔＦＡＤ２－４、－５、－６、－７、－８、－９は、発育中の胚において観察されなかった。低いが、検出可能であるＣｔＦＡＤ２－１０および－１１の発現レベルは、発育中の種子中において、さらには、ベニバナ種子が成熟期を迎える晩期の発育段階において観察された。ＣｔＦＡＤ２－４、－６、－７、－９、および－１１はすべて、子葉および胚軸を含む若い実生組織において高いレベルの発現を示した。根特異的であるように思われたＣｔＦＡＤ２－５および－８ならびにＣｔＦＡＤ２－１０は、花組織において選択的に発現され、比較的低いレベルで、発育中の種子および１０日齢の実生組織を含む、試験された様々な他の組織に検出された。

【０３６６】

総ＲＮＡ鋳型を用いるが、逆転写酵素を用いない対照反応物において、４０サイクルの増幅後、増幅生成物は検出されず、このことは、ＲＮＡ調製物における汚染ゲノムＤＮＡの不在を示した。

【０３６７】

実施例７．ベニバナ株Ｓ３１７における遺伝子突然変異体の実証

128

インドからのベニバナ導入において見出されたベニバナにおける最初に特定された高オレイン酸の特徴は、単一遺伝子座ＯＬでｏｌと表記される部分的に劣性な対立遺伝子によって支配された（Ｋｎｏｗｌｅｓ ａｎｄ Ｈｉｌｌ，１９６４）。ｏｌｏｌ遺伝子型のオレイン酸含量は、通常、温室栽培された植物において、７１～７５％であった（Ｋｎｏｗｌｅｓ，１９８９）。Ｋｎｏｗｌｅｓ（１９６８）は、ｏｌ対立遺伝子をベニバナ繁殖プログラムに組み入れ、米国では、１９６６年に最初の高オレイン酸（ＨＯ）ベニバナ変種「ＵＣ－１」を公開し、これに続いて、改善された変種「Ｏｌｅｉｃ Ｌｅｅｄ」、ならびにＳａｆｆｏｌａ３１７（Ｓ－３１７）、Ｓ－５１７、およびＳ－５１８を含むＳａｆｆｏｌａシリーズを公開した。高オレイン酸（ｏｌｏｌ）遺伝子型は、異なる温度で比較的安定していた（Ｂａｒｔｈｏｌｏｍｅｗ，１９７１）。さらに、Ｋｎｏｗｌｅｓ（１９７２）はまた、３５～５０％のオレイン酸のホモ接合条件で生成された同じ遺伝子座での異なる対立遺伝子ol_1も説明した。ｏｌｏｌ遺伝子型とは対照的に、ol_1ol_1遺伝子型は、温度に対して強い応答を示した（Ｋｎｏｗｌｅｓ，１９７２）。

【０３６８】

より高いオレイン酸含量（８５％超）を有するさらなる遺伝資源が報告された（Ｆｅｒｎａｎｄｅｚ－Ｍａｒｔｉｎｅｚ ｅｔ ａｌ．，１９９３、Ｂｅｒｇｍａｎ ｅｔ ａｌ．，２００６）。ベニバナにおける最大８９％のオレイン酸含量は、元々、Ｂａｎｇｌａｓｅｓｈを起源とする遺伝資源アクセッションＩ４０１４７２において、Ｆｅｒｎａｎｄｅｚ－Ｍａｒｔｉｎｅｚ ｅｔ ａｌ．（１９９３）によって報告された。Ｂｅｒｇｍａｎ ｅｔ ａｌ．（２００６）によって開発されたＭｏｎｔｏｌａシリーズは、Ｋｎｏｗｌｅｓ ａｎｄ Ｈｉｌｌ（１９６４）によって記載される、ｏｌｏｌ対立遺伝子を含有する「ＵＣ－１」変種において、オレイン酸の最高レベルを明らかに超える、８０％超のオレイン酸を含有する。異種交配による遺伝分析および分離比分析、高オレイン酸および非常に高いオレイン酸株は、これらの２つの株がＯＬ遺伝子座で同じ対立遺伝子を共有することを示唆した。非常に高いオレイン酸含量（８５％）は、ｏｌ対立遺伝子を組み合わせ、オレイン酸への小さな陽性結果を有する遺伝子を修飾することによって得た（Ｈａｍｄａｎ ｅｔ ａｌ．，２００９）。

【０３６９】

高オレイン酸突然変異株Ｓ－３１７のインビトロ生化学的特性分析

Ｓｔｙｍｎｅ ａｎｄ Ａｐｐｅｌｑｖｉｓｔ（１９７８）によって記載されるように、ベニバナミクロソームを、開花後（ＤＰＡ）約１５日目の中期の成熟段階で高オレイン酸遺伝子型Ｓ－３１７の発育中の種子から新た

129

に調製した。標準的な９０μＬの反応混合物は、０．１ｍｍｏｌのリン酸カリウム緩衝液ｐＨ７．２中に、４０μｇのミクロゾームタンパク質、２ｎｍｏｌ［^{14}Ｃ］オレオイル－ＣｏＡを含有した。次いで、１０μＬの５０ｍＭ　ＮＡＤＨを添加し、さらに5、１０、または２０分間インキュベーションを継続した。９０μＬの０．１５Ｍ　酢酸を添加することによって、反応を停止し、脂質は、５００μＬのＣＨＣｌ$_3$：ＭｅＯＨ（１：１）で抽出した。より低いＣＨＣｌ$_3$相を回収し、それからの極性脂質を、ＣＨＣｌ$_3$／ＭｅＯＨ／ＨＡｃ／Ｈ$_2$Ｏ（９０：１５：１０：３　ｖ／ｖ／ｖ／ｖ）の溶媒系を使用して、薄膜クロマトグラフィー（ＴＬＣ）によって分離した。ＰＣに対応するスポットを、プレートから削り取り、会合した脂肪酸基を、２ｍｌのＭｅＯＨ中２％硫酸中、９０℃で３０分間トランスメチル化した。得られたＦＡＭＥを、ヘキサン：ＤＥＥ：ＨＡｃ（８５：１５：１　ｖ／ｖ／ｖ）でＡｇＮＯ$_3$処理したＴＬＣプレート上で分離した。^{14}Ｃ標識したオレイン酸塩およびリノール酸メチルエステル標準物質を、参照としてプレート上にスポッティングした。プレートを曝露し、Ｆｕｊｉｆｉｌｍ　ＦＬＡ－５０００　ｐｈｏｓｐｈｏｒｉｍａｇｅｒによって分析した。

それぞれの試料の放射をＦｕｊｉｆｉｌｍ　Ｍｕｌｔｉ　Ｇａｕｇｅソフトウェアで定量化した。

【０３７０】

野生型ミクロソームによる反応物へのＮＡＤＨの添加時に、添加した［^{14}Ｃ］オレオイル－ＣｏＡは、［^{14}Ｃ］リノール酸塩の出現と同時に、１０分以内ですぐに消失したことが観察され、これは、野生型ベニバナミクロソームにおける、オレイン酸塩のリノール酸塩への効率的な変換を示した。対照的に、高オレイン酸遺伝子型Ｓ－３１７については、［^{14}Ｃ］オレイン酸塩の［^{14}Ｃ］リノール酸塩に対する著しく高い比が、時間経過を通じてインビトロ反応において見出され（表１２）、ミクロソームによるオレイン酸塩の不飽和化によるリノール酸の生合成がこの遺伝子型において劇的に減少したことを示した。

【表１２】

ベニバナミクロソームにおけるＣ１８：１由来のＣ１８：２生成物のパーセンテージ

時間	WT		HO	
(分)	C18:1	C18:2	C18:1	C18:2
0	99.2±1.1	0.8±1.1	100.0±0.0	0.0±0.0
5	79.6±1.2	20.4±1.2	99.4±0.3	0.6±0.3
10	69.6±0.4	30.4±0.4	95.4±1.6	4.6±1.6
20	60.6±0.6	39.4±0.6	95.1±1.5	4.9±1.5

n=2

【０３７１】

高オレイン酸塩対立遺伝子ｏｌの分子特性化

ベニバナにおける高オレイン酸遺伝子型（ｏｌｏｌ）の分子基盤を理解するために、２つの種子により発現したＦＡＤ２　ｃＤＮＡ、すなわち、ＣｔＦＡＤ２－１およびＣｔＦＡＤ２－２を、３つの高オレイン酸変種：Ｓ－３１７、ＬｅＳａｆ　４９６、およびＣＷ９９－ＯＬからＰＣＲによって増幅し、配列決定した。３つの高オレイン酸変種のすべてからのＣｔＦＡＤ２－１遺伝子の全コード領域を網羅するｃＤＮＡは、互いにヌクレオチド配列において特定され、野生型変種ＳＵ由来のＣｔＦＡＤ２－１　ｃＤＮＡと約９８％配列同一性を共有し、これには、野生型と比較して、ＨＯ遺伝子型において、１つのヌクレオチド欠失と、２２のヌクレオチド置換とを含んだ。単一の塩基対欠失は、ＣｔＦＡＤ２－１コード領域のほぼ中央にある第１のＡＴＧから計数してヌクレオチド６０６で見出された。この欠失は、欠失直後に停止コドンを作製した翻訳後リーディングフレーム中にシフトを生じ、そのため、第３のヒスチジンボックスを含まない、予測された切断型ポリペプチドをコードした３つのｏｌｏｌ変種の突然変異遺伝子が、野生型タンパク質中に存在した（図６）。さらなる突然変異が突然変異遺伝子中において蓄積されたことを示唆するｏｌ対立遺伝子の欠失した単一のヌクレオチド部位付近のＤＮＡ配列中に比較的高いレベルの配列変異があったことは、注目に値した。。

130

【０３７２】

また、ＣｔＦＡＤ２－１およびＣｔＦＡＤ２－２の５’ＵＴＲイントロンを含むＤＮＡ領域を、ｏｌｏｌ突然変異Ｓ－３１７から単離し、野生型イントロンと比較した。Ｓ－３１７からのＣｔＦＡＤ２－１イントロンは、１１４４ｂｐの長さであり、１０８３ｂｐの長さの野生型ＳＵイントロンよりも６１ｂｐ長かった。ＣｔＦＡＤ２－１イントロンのヌクレオチド配列の比較は、７６．８％の全配列同一性を示し、このイントロンは、２７の消失、および９５の単一ヌクレオチド置換がある点で異なることを示した（図７）。

【０３７３】

興味深いことに、突然変異遺伝子におけるヌクレオチド置換は、欠損ＣｔＦＡＤ２－１のコード領域に対応する１１４２ｂｐ長の領域において均等に分散されず、２２のうちの１４（６３．６％）の置換がヌクレオチド欠失付近で、ほとんどが単一のヌクレオチド欠失のちょうど下流１２３ｂｐ内に存在した。対照的に、野生型および突然変異遺伝子型におけるＣｔＦＡＤ２－２イントロンは、わずか１２のヌクレオチド置換および１つの２－ｎｔ消失を有する、９９．５％の全配列同一性を共有した。これは、一部の選択圧がＨＯ突然変異体において欠損ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子に生じたか、あるいは、恐らく、ＣｔＦＡＤ２－１突然変異が古い起源から成り、Ｃ．パラエスチヌス等のベニバナの子孫種に起源を有し得る可能性がさらに高いことを示す。

【０３７４】

市販の高オレイン酸変種Ｓ－５１８由来のＥＭＳ突然変異体（Ｓ－９０１）が、米国特許第ＵＳ５，９１２，４１６号に記載されている。遺伝学研究は、この新しい遺伝子型の、いわゆるｏｌ$_2$対立遺伝子がＯＬ遺伝子座に

おいてｏｌおよびｏｌ1 対立遺伝子とは異なることを示したが、その分子的性質は、Ｗｅｉｓｋｅｒ（米国特許第ＵＳ５，９１２，４１６号）によって決定されなかった。Ｓ－９０１遺伝子型は、成熟種子における、８９．５～９１．５%の全脂肪酸に対してオレイン酸のレベルの増加を特徴とした。飽和脂肪酸の減少、すなわち、パルミチン酸では約４%減少、ステアリン酸では約２．５%減少した。しかしながら、Ｓ－９０１は、正常な植物表現型を示さず、生育および収率を含むことに苦戦した。形態学的には、それは、その親株Ｓ－５１８と比較して短く、花の頭部は小さかった。それはまた、遅く開花し、種子内には油が少なかった。

【０３７５】

高オレイン酸繁殖のための完全なＰＣＲマーカー設計

ＨＯ表現型に関与する原因となる突然変異体であると結論付けられる突然変異ＣｔＦＡＤ２－１対立遺伝子における単一のヌクレオチド欠失配列多型は、突然変異ｏｌ対立遺伝子を追跡するために高効率の分子マーカーの分子基盤として開発された。したがって、本発明者らは、それが異型接合状態中に存在した場合でさえ、繁殖目的または変種の特定目的のために突然変異ｏｌ対立遺伝子の特定および選択を可能にした分子マーカーアッセイを開発した。それによって、分子マーカー支援選抜は、脂肪酸表現型に対してスクリーニングされなければならない植物の余分な世代を生成する必要をなくす。完全な分子マーカーアッセイと組み合わせた単純な遺伝学は、ベニバナ育種家が、繁殖プログラムに高オレイン酸の特質を迅速に組み込むことを可能にするであろう。

【０３７６】

ＰＣＲ反応に基づいて差次的マーカーを容易に生成するために、野生型ＳＵと高オレイン酸遺伝子型Ｓ－３１７との間のＣｔＦＡＤ２－１のエクソンには、不十分な配列の突然変異があったように思われた。しかしながら、本発明者らは、ＯＬ対立遺伝子とｏｌ対立遺伝子との間のＣｔＦＡＤ２－１の５’ＵＴＲイントロンの比較的高い配列分散をうまく利用し得た。独自のＰＣＲプライマーの設計を可能にしたこれらの２つの対立遺伝子間の高度な可変配列の伸長があった。以下の例示的なプライマーは、野生型ＳＵではなく、ｏｌｏｌ突然変異対立遺伝子を担持する高オレイン酸遺伝子型からの３１５ｂｐ長の特定の生成物を増幅するように設計された。ＨＯ－センス：５’－ＡＴＡＡＧＧＣＴＧＴＧＴＴＣＡＣＧＧＧＴＴＴ－３’（配列番号１４０）およびＨＯ－アンチセンス：５’－ＧＣＴＣＡＧＴＴＧＧＧＧＡＴＡＣＡＡＧＧＡＴ－３’（配列番号１４１）（図７）。変種ＳＵにおいて野生型遺伝子に特異的な別の対の例示的なプライマーは、以下のような、６０３ｂｐのＰＣＲ生成物を生じた：ＨＬ－センス：５’－ＡＧＴＴＡＴＧＧＴＴＣＧＡＴＧＡＴＣＧＡＣＧ－３’（配列番号１４２）およびＨＬ－アンチセンス：５’－ＴＴＧＣＴＡＴＡＣＡＴＡ

ＴＴＧＡＡＧＧＣＡＣＴ－３’（配列番号１４３）（図７）。ベニバナＫＡＳＩＩ遺伝子由来の一対のプライマー、ｃｔｋａｓＩＩ－センス：５’－ＣＴＧＡＡＣＴＧＣＡＡＴＴＡＴＣＴＡＧＧ－３’（配列番号１４４）およびｃｔｋａｓＩＩ－アンチセンス５’－ＧＧＴＡＴＴＧＧＴＡＴＴＧＧＡＴＧＧＧＣＧ－３’（配列番号１４５）は、鋳型ＤＮＡと同等の負荷および良好なＰＣＲ性能を確立するために、陽性対照として使用された。

【０３７７】

ＰＣＲ反応条件は、９４℃で２分間、続いて、９４℃で３０秒間、５８℃で３０秒間、および７２℃で３０秒間の４０サイクルであった。反応生成物は、１%のアガロースゲル上で電気泳動によって分離し、このゲルのエチジウムブロマイド染色後に紫外線光下で可視化した。約３００ｂｐの断片が、試験された５つの高オレイン酸遺伝子型すべて、つまり、Ｓ－３１７、Ｓ－５１７、ＣＷ９９－ＯＬ、ＬｅＳａｆ４９６、およびＣｉａｎｏ－ＯＬに対する増幅反応について観察されたが、そのような断片は、野生型遺伝子型ＳＵには不在であった。逆に、約６００ｂｐの断片が野生型ベニバナＳＵに対する増幅に存在したが、試験した高オレイン酸変種のいずれにも存在しなかった。陽性対照として、ＫＡＳＩＩ遺伝子由来の１９８ｂｐの帯を、試験した株のすべてに対する反応物（ｅｒａｃｔｉｏｎ）で増幅した。アンプリコンの特定は、ＤＮＡシークエンシングによって確認された。

【０３７８】

高オレイン酸対立遺伝子と野生型ベニバナ対立遺伝子との間のＣｔＦＡＤ２－１遺伝子の５’ＵＴＲイントロン領域内の配列分散は、それによって、ＣｔＦＡＤ２－１突然変異の存在または不在のためのＰＣＲマーカー診断の開発を容易にする。それは、遺伝的背景がどうであってもｏｌ対立遺伝子に完全に連結された、つまり、それは、完全に連結したマーカーであった。しかしながら、分子マーカーは優性マーカーであり、その結果として、そのマーカーのみの使用は、ｏｌ対立遺伝子におけるホモ接合遺伝子型とヘテロ接合遺伝子型の区別を可能にし得なかった。これを克服するために、野生型Ｏｌ対立遺伝子のみ増幅する別の対のＰＣＲプライマーが設計された。それ故に、高オレイン酸に特異的なＰＣＲプライマーと組み合わせたそのような野生型に特異的なプライマーの使用が、ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子座でホモ接合遺伝子型とヘテロ接合遺伝子型を区別することを可能にした。

【０３７９】

ＣｔＦＡＤ２－１発現は、高オレイン酸遺伝子型において劇的に減少する。

上の節において、ＣｔＦＡＤ２－１が発育中の種子においてのみ発現され、若いベニバナ実生由来の葉、根、花、子葉、および胚軸を含む試験した様々な他の組織には検出されなかったことを示した。ＣｔＦＡＤ２－１は、

133

脂肪酸の代謝速度が高い発育中の種子中において高度に発現され、比較的短期間に大部分はＣ１８：２を有する活性な油蓄積をもたらした。ＣｔＦＡＤ２－１は、種子発育時にほぼ中間の地点でその最高の発現レベルを有し、種子発育の早期および晩期段階の両方でより中度の発現レベルを有した。

【０３８０】

ＲＴ－ｑＰＣＲアッセイ方法を使用して、ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子の正規化された遺伝子発現のレベルを、３つの高オレイン酸変種、すなわち、Ｓ－３１７、Ｌｅｓａｆｆ４９６、およびCW９９－ＯＬにおいて測定し、野生型遺伝子型ＳＵの発育中の種子中のものと比較した。図８中に見られ得るように、ＣｔＦＡＤ２－１発現は、野生型ベニバナ遺伝子型ＳＵにおける発育中の胚の３つの段階すべてにおいて検出され、中期の成熟段階で観察された最高レベルの発現を有し、既存の結果と一致し、この主要なＦＡＤ２遺伝子の一時的な転写パターンを確認した。しかしながら、ＣｔＦＡＤ２－１転写は、３つの高オレイン酸変種Ｓ－３１７、Ｌｅｓａｆｆ４９６、およびCW９９－ＯＬにおいてわずかしか検出できず（図８）、突然変異胚中において、この遺伝子からのＲＮＡ転写物の高レベルの不安定度を示した。

【０３８１】

対照的に、ＣｔＦＡＤ２－２からの転写物のレベルは、野生型および高オレイン酸遺伝子型と類似しており、ＣｔＦＡＤ２－２発現がHO胚内において影響を受けず、ならびに、ＲＮＡ調製物がアッセイに対して好ましくは純粋であった。したがって、ＣｔＦＡＤ２－２発現はまた、野生型種子中においてＣｔＦＡＤ２－１に対してよりもはるかに低いレベルであるが、発育中のベニバナ種子中の貯蔵脂質に対して脂肪酸のΔ１２－不飽和化に寄与し得、同様に、根、葉、および茎における膜脂質に対して脂肪酸のΔ１２－不飽和化に関与し得ると結論付けられた。ＣｔＦＡＤ２－２発現は、ＣｔＦＡＤ２－１突然変異体の発育中のベニバナ種子中におけるＣｔＦＡＤ２－１活性の喪失に応答する、またはそれに対して補償として高オレイン酸突然変異に対して上昇したことにおける証拠はなかった。

【０３８２】

HO株における劇的に減少したＣｔＦＡＤ２－１転写物は、非センス媒介ＲＮＡ分解（NMD）によって引き起こされる。

HO胚内のＣｔＦＡＤ２－１転写物の劇的に減少したレベルは、未成熟停止コドンが単一のヌクレオチド欠失直後にコード配列の中央に見られたため、ＣｔＦＡＤ２－１　ｍＲＮＡの非センス媒介ｍＲＮＡ分解（NMD）によって引き起こされた可能性がある。NMD系は、ゲノムの突然変異、転写エラー、およびミススプライシング等の想定外のエラーを生じる未成熟終止コドン（ＰＴＣ）を含む異常なｍＲＮＡの分解に関与する機構であると

134

考えられる。それは、広く真核生物中に存在する機構であり、特に、酵母菌および哺乳動物において広く研究されている。高等植物においては、少ししか研究されていないが、大豆Ｋｕｎｉｔｚ型トリプシン阻害剤遺伝子（Ｋｔｉ３）、インゲンマメ由来のフィトヘムアグルチニン遺伝子（ＰＨＡ）（Ｊｏｆｕｋｕ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９、Ｖｏｅｌｋｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９０）、エンドウフェレドキシン遺伝子（ＦＥＤ１）（Ｄｉｃｋｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，１９９４）、およびイネｗａｘｙ遺伝子（Ｉｓｓｈｉｋｉ　ｅｔａｌ．，２００１）を含むいくつかの報告がある。

【０３８３】

これらの実験において、ベニバナ種子油中において高オレイン酸の特質をもたらすｏｌ突然変異が、発育中の種子中において低レベルのＣｔＦＡＤ２－１　ｍＲＮＡ蓄積と相関したことを示した。先行研究は、ｏｌ対立遺伝子が半劣性であり、小ＲＮＡによって媒介された転写後の遺伝子サイレンシング機構と一致しなかったことを示した。遺伝子サイレンシングは、二重鎖ＲＮＡから生成された２１～２４ｎｔのｓｉＲＮＡに関与し、アンチセンスまたはヘアピンＲＮＡの転写を生じ、優性遺伝子または半優性遺伝子の遺伝子座として遺伝的に作用し得る（Ｂｒｏｄｅｒｓｅｎ　ａｎｄ　Ｖｏｉｎｎｅｔ，２００６）。

ｏｌ突然変異の機構がＲＮＡｉ関連遺伝子サイレンシングとは異なることを確認するために、以下のように、小ＲＮＡ配列決定を行った。

【０３８４】

高オレイン酸遺伝子型Ｓ－３１７および野生型ＳＵに由来する２つの小ＲＮＡライブラリーは、中期の成熟発育中の胚から単離されたプールしたＲＮＡを使用して生成された。

Ｓｏｌｅｘａ技術（Ｈａｆｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００８）を用いて小ＲＮＡライブラリーのバルク配列決定を行った。ＩｌｌｕｍｉｎａのＳｏｌｅｘａ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅｒ上で、これらの２つのライブラリーの配列決定を行い、試料を並んで走行させた。ＳＵおよびＳ－３１７小ＲＮＡライブラリーの配列決定はそれぞれ、合計で２３，１６０，２６１および２１，６９６，８５２の未処理の読みを生じた。これらの読みの分析はそれぞれ、１８～３０ヌクレオチド（ｎｔ）の長さの範囲に及ぶ２２，８６０，０９８および２１，４２７，３９２の配列の特定をもたらした。ＳＵおよびＳ－３１７ライブラリーにおいてＣｔＦＡＤ２－１に対応する小ＲＮＡの存在および分散が決定された。ＣｔＦＡＤ２－１に対応する低いほとんど検出できないレベルの小ＲＮＡのみが小ＲＮＡライブラリーの両方から検出され、ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子のコード領域上にほぼ均等に分散された。野生型ライブラリーと高オレイン酸ライブラリーとの間の明らかな相違はなかった。

135

【０３８５】
このデータから、小ＲＮＡ媒介された転写後の遺伝子サイレンシングは、主要な機構ではなく、突然変異ＣｔＦＡＤ２－１の転写物の蓄積を阻止したことが結論付けられた。
【０３８６】
Ｎ．ベンタミアーナ葉における一過的発現研究
ＮＭＤ現象をさらに調査するために、本発明者らは、Ｎ．ベンタミアーナ葉における野生型および高オレイン酸遺伝子型の両方に由来するＣｔＦＡＤ２－１の一過的発現についての実験を行った。
【０３８７】
ＣｔＦＡＤ２－１　ＯＲＦのそれぞれを、ＣａＭＶ－３５Ｓプロモーターの制御下で、センス方向に修飾されたｐＯＲＥ０４バイナリーベクターに挿入した。３５Ｓ：ＣｔＦＡＤ２－１またはその突然変異形態３５Ｓ：ＣｔＦＡＤ２－１Δのいずれかを内部に有するアグロバクテリウムツメファシエンス株ＡＧＬ１を、実施例５に記載される、３５Ｓ：Ｐ１９とともに十分に膨張したＮ．ベンタミアーナ葉の裏面に浸潤した。２４℃でさらに５日間生育させた後、浸潤した領域を切除し、Ｒｎｅａｓｙミニキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して試料から総ＲＮＡを得た。ＣｔＦＡＤ２－１　ＲＮＡレベルを測定するために、実施例１に記載されるように、Ｐｌａｔｉｎｕｍ　ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ｑＰＣＲ　ＳｕｐｅｒＭｉｘ－ＵＤＧ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、リアルタイムｑＰＣＲアッセイを３重で行い、ＡＢＩ　７９００ＨＴ配列検出システム上で操作した。ＰＣＲは、初めに、４８℃で３０分間、次いで、９５℃で１０分間、続いて、９５℃で１５秒間、および６０℃で６０秒間を４０サイクルの条件下で行った。外因性ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子に対するプライマーは、センス：５’－ＧＴＧＴＡＴＧＴＣＴＧＣＣＴＣＣＧＡＧＡ－３’（配列番号１４６）、アンチセンス：５’－ＧＣＡＡＧＧＴＡＧＴＡＧＡＧＧＡＣＧＡＡＧ－３’（配列番号１４７）であった。参照遺伝子、ベニバナＣｔＫＡＳＩＩを使用して、発現レベルを正規化し、その特異的プライマーは、センス：５’－ＣＴＧＡＡＣＴＧＣＡＡＴＴＡＴＣＴＡＧＧ－３’（配列番号１４４）、およびアンチセンス：５’－ＧＧＴＡＴＴＧＧＴＡＴＴＧＧＡＴＧＧＧＣＧ－３’（配列番号１４５）であった。Ｎ．ベンタミアーナ葉において、野生型ＳＵ変種由来の３５Ｓ－ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子から高レベルのＣｔＦＡＤ２－１発現が観察された。対照的に、高オレイン酸遺伝子型由来の３５Ｓ－ＣｔＦＡＤ２－１Δ遺伝子に対してはるかに低いレベルの発現が観察された。
【０３８８】
Ｃｌｏｕｇｈ　ａｎｄ　Ｂｅｎｔ（１９９８）の方法に従って、Ａ．サリアナ生態型Ｃｏｌ－０植物を、ＣｔＦＡＤ２－１またはＣｔＦＡＤ２－１Δのいずれかのコード領域を活発にする種子特異的プロモーターＦｐ１を内部に有するバイナリーベクターを持つＡ．ツメファシエンスＡＧＬ１で形質転換された。総ＲＮＡを、Ｒｎｅａｓｙミニキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、得られた形質転換した植物の子孫の中期の成熟段階の胚を含む長角果から単離した。遺伝子発現研究を、ＲＮＡ調製物を使用して、リアルタイムＲＴ－ｑＰＣＲアッセイによって行い、上記のように、３重で行った。ＳＵ由来のＦｐ１－ＣｔＦＡＤ２－１を発現するアラビドプシス長角果において、高レベルのＣｔＦＡＤ２－１発現が観察されたが、高オレイン酸遺伝子型由来のＦｐ１－ＣｔＦＡＤ２－１Δの発現は、比較すると、劇的に減少した。
【０３８９】
突然変異ＣｔＦＡＤ２－１の転写物が総計で劇的に減少したが、ＣｔＦＡＤ２－１に特異的な小ＲＮＡは、野生型遺伝子由来の小ＲＮＡと比較して、発育中の高オレイン酸ベニバナ種子において著しく高いレベルで生成されなかったことを示した。したがって、高オレイン酸遺伝子型におけるＣｔＦＡＤ２－１　ＲＮＡの減少は、ＮＭＤによるものであり、小ＲＮＡ媒介性転写後の遺伝子サイレンシング機構とは異なると結論付けた。また、ＮＭＤ現象は、突然変異コード領域がＮ．ベンタミアーナ葉またはアラビドプシス長角果のいずれかにおいて外因的に発現された場合に観察された。
【０３９０】
実施例８．ＦＡＴＢをコードするための候補であるベニバナｃＤＮＡの単離
ベニバナＦＡＴＢ　ｃＤＮＡ配列の単離
ベニバナ種子油は、約７％のパルミチン酸を含有する。この脂肪酸は、発育中の種子細胞のプラスチドで合成され、そこからそれを、トリアシルグリセロールへのその組み込みのために細胞の細胞質ゾルに輸出される。パルミチン酸輸出のための主要な酵素は、パルミトイル部分とアシル担体タンパク質（ＡＣＰ）との間のチオエステル結合を加水分解するパルミトイル－ＡＣＰチオエステラーゼであり、ここに、アシル基を共有結合するが、それはプラスチドで合成される。酵素パルミトイル－ＡＣＰチオエステラーゼは、ＦＡＴＢと表される一連の溶解性プラスチドを標的とする酵素に属する。種子油植物において、この酵素は、基質として短鎖飽和アシル－ＡＣＰに対して特異性を示す。初めに、ＦＡＴＢ酵素をコードする遺伝子を、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ月桂樹（ウンベルラリアカリフォルニカ（Ｕｍｂｅｌｌｕｌａｒｉａ　ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ））由来のラウリン酸（Ｃ１２：０）等の中鎖長飽和脂肪酸を蓄積する植物種から単離した。その後の研究は、ＦＡＴＢ相同分子種が、すべての植物組織中、主に種子中に存在し、Ｃ８：０－ＡＣＰからＣ１８：０－ＡＣＰの範囲に及ぶ基質特異性を有することを示した。アラビドプシスおよびベニバナを含むほとんどの温暖な油糧種子作物において、パルミチン酸

137

は、種子油中において主要な飽和脂肪酸である。

【０３９１】

ＦＡＴＢのための候補をコードされるベニバナｃＤＮＡを単離するために、実施例１に記載されるように、発育中のベニバナ種子のｃＤＮＡライブラリーを、綿（ゴシッピウムヒルスツム）由来のＦＡＴＢ　ｃＤＮＡ断片から成る異種プローブを使用してスクリーニングした。ＣｔＦＡＴＢ－Ｔ１２と命名されるある完全長ｃＤＮＡを、ベニバナ種子ｃＤＮＡライブラリーから単離した。このｃＤＮＡは、３４３アミノ酸のポリペプチドをコードする１０２９ヌクレオチド長のオープンリーディングフレームを含んだ。その５’および３’ＵＴＲはそれぞれ、２３６ｎｔおよび３３６ｎｔの長さであった。ＣｔＦＡＴＢ－Ｔ１２ポリペプチドは、らせんおよびマルチストランドシート折り畳みの２つの繰り返しを含んだ約６０アミノ酸および２１０アミノ酸残基コアの予測された輸送ペプチド、一般には、いわゆる、ホットドッグ折り畳みタンパク質を有した。

【０３９２】

ベニバナのためのＣｏｍｐｏｓｉｔａｅ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｐｒｏｊｅｃｔ（ＣＧＰ）の発現配列タグ（ＥＳＴ）データベース（ｃｇｐｄｂ．ｕｃｄａｖｉｓ．ｅｄｕ／ｃｇｐｄｂ２）から、ＣｔＦＡＴＢ－Ｔ１２に対して相同性を有する３つの異なるＥＳＴ、すなわち、ＥＬ３７９５１７、ＥＬ３８９８２７、およびＥＬ３９６７４９が特定された。それぞれが、部分長であった。対応する遺伝子はそれぞれ、ＣｔＦＡＴＢ－Ａ、ＣｔＦＡＴＢ－Ｂ、およびＣｔＦＡＴＢ－Ｃと表した。ベニバナ種子ｃＤＮＡライブラリーから単離された完全長ｃＤＮＡ　ＣｔＦＡＴＢ－Ｔ１２は、それらの重複する領域内のＣｔＦＡＴＢ－ＣからのＥＳＴへのヌクレオチド配列において特定された。ＣｔＦＡＴＢ－Ａは、他の２つのＣｔＦＡＴＢ配列と比較して、そのヌクレオチド配列においてより分岐したと思われた。

【０３９３】

リアルタイムｑＰＣＲ分析によるＣｔＦＡＴＢ遺伝子の発現プロファイル

実施例１に概説されるように、３つのＣｔＦＡＴＢ遺伝子の遺伝子発現プロファイルを、リアルタイムｑＰＣＲを用いて研究した。３つの遺伝子のそれぞれの独自の領域に対応するオリゴヌクレオチドプライマーが設計され、これには、ＣｔＦＡＴＢ－Ａ、センスプライマー：５’－ＡＧＡＧＡＴＣＡＴＴＧＧＡＧＡＣＴＡＧＡＧＴＧ－３’（配列番号１４８）；アンチセンスプライマー：５’－ＣＣＣＡＴＣＡＡＧＣＡＣＡＡＴＴＣＴＴＣＴＴＡＧ－３’（配列番号１４９）；ＣｔＦＡＴＢ－Ｂ、センスプライマー：５’－ＣＴＡＣＡＣＡＡＴＣＧＧＡＣＴＣＴＧＧＴＧＣＴ－３’（配列番号１５０）；アンチセンスプライマー：５’－ＧＣＣＡＴＣＣＡＴＧＡＣＡＣＣＴＡＴＴＣＴＡ－３’（配列番号１５１）；ＣｔＦＡＴＢ－Ｃ、センスプライマー：５’－ＣＣＴＣＡＣＴＣＴＧＧＧＡＣＣＡＡＧＡＡＡＴ－３’（配列番号１５２）；アンチセンスプライマー：５’－ＴＴＣＴＴＧＧＧＡＣＡＴＧＴＧＡＣＧＴＡＧＡＡ－３’（配列番号１５３）が含まれた。実施例１に記載されるように、ＰＣＲ反応は、３重で行われた。

138

【０３９４】

図９中に示されるように、ＣｔＦＡＴＢ－Ａは、試験された葉、根、および発育中の胚の３つの段階すべてにおいて、低い発現レベルを示した。ＣｔＦＡＴＢ－Ｂは、葉および根において活性であったが、葉および根においてよりも発育中の胚においてより低い発現を示した。これは、この遺伝子がもしあったとしても、発育中の種子中の脂肪酸生合成において、小さい役割のみを果たし得ることを示唆した。対照的に、ＣｔＦＡＴＢ－Ｃは、試験した組織すべてにわたって、特に、発育中の胚中において高い発現レベルを示した。

これは、ＣｔＦＡＴＢ－Ｃが、ベニバナ種子油中においてパルミチン酸の生成のためにＦＡＴＢをコードする主要な遺伝子であったことを示した。これは、種子胚ライブラリー由来のわずかに１つのＦＡＴＢ　ｃＤＮＡクローン、すなわち、ＣｔＦＡＴＢ－Ｔ１２の回収と一致し、ＣｔＦＡＴＢ－Ｃに対する配列と同一であった。これらのデータに基づいて、ＣｔＦＡＴＢ－Ｔ１２（ＣｔＦＡＴＢ－Ｃ）由来の約３００ｂｐのＤＮＡ断片が、以下の実施例に記載されるように、ベニバナ種子中においてＦＡＴＢの下方調節のためのｈｐＲＮＡ構築物の調製において使用される遺伝子配列として選択された。

【０３９５】

実施例９：ＦＡＤ６をコードするベニバナｃＤＮＡの単離および発現

ベニバナＦＡＤ６　ｃＤＮＡ配列の単離

ミクロソームおよび葉緑体膜脂質および種子貯蔵油に見出される、明確に異なる脂肪酸組成は、脂肪酸生合成を調節することによって、この組成を制御するように操作する複雑な代謝ネットワークの結果であり、いわゆる、原核生物および真核生物の経路の両方を通じて流動する。ミクロソームＦＡＤ２酵素は、細胞質中において、プラスチドからオレイン酸の輸出、およびＣｏＡエステルへの変換後に、ＥＲにおいて、オレイン酸塩をリノール酸塩に変換する際に重要な役割を有することは明らかである。葉緑体オメガ－６デサチュラーゼ（ＦＡＤ６）はそれぞれ、ホスファチジルグリセロール、モノガラクトシルジアシルグリセロール、ジガラクトシルジアシルグリセロール、およびスルホキノボシルジアシルグリセロールを含むすべての１６：１－または１８：１－を含有する葉緑体膜脂質上で、１６：１および１８：１脂肪酸を１６：２および１８：２に不飽和化する酵素である。アラビドプシスｆａｄ６突然変異はそれぞれ、すべての葉緑体脂質上で、１６：１および１８：１の１６：２お

139

よび１８：２への不飽和化において欠失していることが報告された（Ｂｒｏｗｓｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９）。ｆａｄ６突然変異体が低温（５℃）で生育された場合、葉は退緑し、生育速度は、野生型と比較して、著しく減少した（Ｈｕｇｌｙ　ａｎｄ　Ｓｏｍｅｒｖｉｌｌｅ，１９９２）。ＦＡＤ６をコードするｃＤＮＡ配列は、初めに、Ｆａｌｃｏｎｅ　ｅｔ　ａｌ．（１９９４）によってアラビドプシスから単離された。それ以来、ＦＡＤ６およびＦＡＤ６遺伝子をコードするｃＤＮＡは、ブラシカナプス、ポルチュラカオレラセア、大豆、およびリシヌスコミュニスを含むいくつかの植物種から単離されている。

【０３９６】

ベニバナ由来のＦＡＤ６遺伝子によってコードされる葉緑体ω６デサチュラーゼをコードするｃＤＮＡクローンを単離するために、相同配列に対するＣＰＧデータベースを、検索した。８つのＥＳＴ配列、すなわち、ＥＬ３７８９０５、ＥＬ３８０５６４、ＥＬ３８３４３８、ＥＬ３８５４７４、ＥＬ３８９３４１、ＥＬ３９２０３６、ＥＬ３９３５１８、ＥＬ４１１２７５を特定し、８０８ｎｔの単一コンティグ配列に組み立てた。この配列は、無傷５’末端を有したが、３’末端で不完全であった。その後、鋳型として、ベニバナ（ＳＵ）の発育中の種子から作製されたラムダｃＤＮＡライブラリーから抽出されたＤＮＡを使用して、３’ＲＡＣＥ　ＰＣＲ増幅を通じて、完全長ｃＤＮＡを得た。ＰＣＲ条件は、実施例２に記載される通りであった。ｃｔＦＡＤ６－ｓ２と表された単一オリゴプライマーは、このプライマーの配列がｃＤＮＡライブラリーのベクター中に存在したため、Ｍ１３順方向プライマーと組み合わせた増幅反応において使用された。ｃｔＦＡＤ６－ｓ２プライマーの配列は、５’－ＣＡＴＴＧＡＡＧＴＣＧＧＴＡＴＴＧＡＴＡＴＣＴＧ－３’（配列番号１５４）であった。４３５アミノ酸の候補ＦＡＤ６ポリペプチドをコードした１３０５ｂｐのオープンリーディングフレームを有した１５４５ｂｐのｃＤＮＡを得た。このポリペプチドは、他のクローン化した植物ＦＡＤ６ポリペプチドと６０～７４％のアミノ酸配列同一性を共有した。ベニバナＦＡＤ６配列と高等植物において特定された代表的なＦＡＤ６色素体Δ１２デサチュラーゼとの間の系統発生関係を示す系統樹が、ベクターＮＴＩによって形成された（図１０）。

【０３９７】

<u>リアルタイムｑＰＣＲ分析によるＣｔＦＡＤ６の発現プロファイル</u>

ＣｔＦＡＤ６の発現プロファイルは、Ｐｌａｔｉｎｕｍ　ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ｑＰＣＲ　ＳｕｐｅｒＭｉｘ－ＵＤＧ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して行われたリアルタイムＲＴ－ｑＰＣＲによって調べられ、実施例１に記載されるように、デフォルトパラメータを用いてＡＢＩ　７９００ＨＴ配列検出システム上で操作した。

140

使用されたプライマーは、ｃｔＦＡＤ６－Ｓ２：５’－ＣＡＴＴＧＡＡＧＴＣＧＧＴＡＴＴＧＡＴＡＴＣＴＧ－３’（配列番号１５５）およびｃｔＦＡＤ６－ａ２：５’－ＧＴＴＣＣＡＡＣＡＡＴＡＴＣＴＴＣＣＡＣＣＡＧＴ－３’（配列番号１５６）であった。反応は、２０ｎｇの総ＲＮＡ鋳型、８００ｍＭのそれぞれのプライマー、０．２５μＬの逆転写酵素、および５μＬのワンステップＲＴ－ＰＣＲマスターミックス試薬を含む１０μＬの全容積で３重で行われた。ＲＴおよび増幅のための条件は、４８℃で３０分間、次いで、９５℃で１０分間、続いて、９５℃で１５秒間、および６０℃で６０秒間を４０サイクルであった。参照遺伝子ベニバナＣｔｋａｓＩＩの発現を使用して、ＦＡＤ６発現レベルを正規化した。実施例１に記載されるように、計算を行った。

【０３９８】

この分析は、ＣｔＦＡＤ６が、葉、根、および発育中の胚の３つの連続的な段階において、比較的低いレベルで発現されたことを示した。発育中の種子中において観察された低い発現レベルは、ＦＡＤ６が種子中のオレイン酸塩の不飽和化において、比較的に小さい役割を有し得るという考えと一致した。

【０３９９】

<u>実施例１０．ベニバナにおける脂肪酸生合成遺伝子をサイレンシングするための遺伝的構築物の設計および調製</u>

ヘアピンＲＮＡ（ｈｐＲＮＡ）は、植物における遺伝子発現を減少させるために広く使用されている一種のＲＮＡ分子である。ヘアピンＲＮＡは、一般に、植物細胞において、サイレンシングされる遺伝子に由来する逆方向反復の配列を含むＤＮＡ構築物から転写される。ｈｐＲＮＡ転写物は、それによって、ハイブリダイズして、ループ配列によって結合される二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）領域を形成する相補的センスおよびアンチセンス配列を有する。そのようなｄｓＲＮＡ構造は、植物細胞において、内因性サイレンシング機構によって処理されて、配列において活性が減少される遺伝子に対応する約２１～２４のヌクレオチドの小ＲＮＡ分子を形成する。これらの小ＲＮＡは、対象となる遺伝子を特異的にサイレンシングする内因性タンパク質で複合体を形成することができる。そのようなサイレンシングは、標的遺伝子部分のＤＮＡメチル化によって媒介される転写レベルで、標的ｍＲＮＡの分解による転写後のレベルで、またはそのｍＲＮＡに結合し、その翻訳を阻害し、それによって遺伝子によってコードされるタンパク質合成を減少させることによって生じ得る。ｈｐＲＮＡが遺伝子ファミリーのメンバー間で共通の配列を含む場合、ｈｐＲＮＡは、配列を有するこれらの遺伝子のそれぞれにサイレンシングし得る。

【０４００】

ベニバナは、本明細書で記載されるように特定される少なくとも１１のメンバーを有する大ファミリーのＦＡＤ

141

２遺伝子（実施例２～６）を有する。ベニバナはまた、特定される少なくとも３つのメンバーを有するＦＡＴＢポリペプチドをコードする複数の遺伝子（実施例８）、および少なくとも１つのＦＡＤ６遺伝子（実施例９）も有する。実際には、上述の実験は、ベニバナにおいて遺伝子ファミリーのすべてのメンバーを特定しなかった可能性がある。ＦＡＤ２およびＦＡＴＢ遺伝子ファミリーのどのメンバーがベニバナ種子油中において見出されるリノール酸または飽和脂肪酸、特に、パルミチン酸の生合成に関与したか、ならびにＦＡＤ６も関与したかどうかを判定するために、いくつかの遺伝的構築物がベニバナ内でｈｐＲＮＡ分子を発現させ、ＦＡＤ２、ＦＡＴＢ、およびＦＡＤ６遺伝子の様々な組み合わせをサイレンシングした。これらのｈｐＲＮＡ構築物のそれぞれは、油合成期間中、発育中のベニバナ種子内で特異的に発現されるように設計された。これは、外来プロモーターまたは構築物を発現するためにベニバナから単離されたプロモーターのいずれかを使用することによって行われ、これらは、植物形質転換によってベニバナ中に導入された。

【０４０１】

ｐＣＷ６００の構築

植物バイナリー発現ベクターが、種子内の導入遺伝子の発現のために設計され、アラビドプシスＯｌｅｓｏｉｎ１遺伝子（ＴＡＩＲウェブサイト遺伝子の注釈Ａｔ４ｇ２５１４０）のプロモーター（配列番号５２）を使用した。単離されたプロモーターは、１１９２ｂｐの長さであり、アクセッション番号ＮＣ００３０７５．７のヌクレオチド１２８９９２９８から開始したが、１１９８ｂｐの配列内で、通常の制限消化配列を避け、後続のクローニングステップを支援するために、６ｂｐを削除した。ＡｔＯｌｅｏｓｉｎプロモーターは、以前、ベニバナおよびブラシカ種における導入遺伝子の強力な種子特異的発現に使用されていた（Ｎｙｋｉｆｏｒｕｋ ｅｔ ａｌ．，１９９５、Ｖａｎｒｏｏｉｊｅｎａｎｄ Ｍｏｌｏｎｅｙ，１９９５）。このプロモーターは、プロモーター断片の両末端に結合したコード領域の強力な種子特異的発現を誘導する双方向性プロモーターである可能性が高かった。アラビドプシスオレオシンプロモーターは、双機能性を有することを特徴とするブラシカナプスオレオシンプロモーターと特徴を共有する（Ｓａｄａｎａｎｄｏｍ ｅｔ ａｌ．，１９９６）。このプロモーターは、化学的に合成され、ｐＧＥＭＴ－ＥａｓｙおよびＫｌｅｎｏｗ断片酵素充填反応によって平滑化されたプロモーターを含むＥｃｏＲＩ断片にクローン化され、ｐＣＷ２６５（Ｂｅｌｉｄｅ ｅｔ ａｌ．，２０１１）のＫｌｅｎｏｗによって平滑化されたＨｉｎｄＩＩＩ部位に連結し、ｐＣＷ６００（ＡｔＯｌｅｏｓｉｎＰ：：空）を生成した。このベクターは、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ（ＨＰＴ）をコードする選択

142

可能なマーカー遺伝子を有し、それによって、形質転換プロセス中、組織培養中のハイグロマイシン（ｈｙｇｏｍｙｃｉｎ）への耐性のための選択を可能にした。また、このベクターには、紫外線照射下で、蛍光による形質転換した細胞または組織の選択を可能にした３５Ｓ：：ＧＦＰ遺伝子が含まれた。ＡｔＯｌｅｏｓｉｎプロモーターを挿入することによって、このベクターは、複数のクローニング部位に位置しているプロモーターの下流およびｎｏｓポリアデニル化シグナル（ｎｏｓ３’）の上流に挿入され得る対象となるコード領域の発現のために設計された。このベクターは、以下に記載される構築物ｐＣＷ６０２およびｐＣＷ６０３の骨格ベクターとして作用した。

【０４０２】

ｐＸＺＰ４１０の構築

亜麻リニンプロモーター（米国特許第ＵＳ７，６４２，３４６号）（配列番号５３）が、ＮｏｔＩ－ＸｈｏＩ断片として、バイナリーベクターｐＴ７－ＨＥＬＬＳＧＡＴＥ１２（Ｗｅｓｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，２００１）に挿入され、ＧａｔｅｗａｙサイレンシングバイナリーベクターｐＸＺＰ４１０を生成した。ベクターｐＸＺＰ４１０は、組織培養中、カナマイシンへの耐性を付与した選択可能なマーカー遺伝子を有し、リニンプロモーターの制御下でヘアピンＲＮＡ構築物の種子特異的発現を可能にした。このベクターは、プロモーターに対して、１つはセンス方向に、もう１つはアンチセンス方向にある２つのイントロンを有し、イントロンに隣接するＡｔｔＬ１およびＡｔｔＬ２組み換え部位を有した。

【０４０３】

ｐＸＺＰ４１０からのサイレンシング構築物を作製するために、サイレンシングされるＧａｔｅｗａｙ侵入ベクター中の標的遺伝子からの２コピーの配列をベクターに挿入し、互いに対して逆方向で、２つのイントロンのうちの１つは、５’で挿入し、もう１つは、３’で挿入して、逆方向反復を形成した。組み換え部位は、前述されるように、Ｇａｔｅｗａｙリコンビナーゼクローニングシステム（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＵＳＡ）を使用することによって、２コピーの挿入を容易に可能にした（Ｗｅｓｌｅｙｅｔ ａｌ．，２００１）。このベクターｐＸＺＰ４１０は、下述のように、ｐＣＷ６３１およびｐＣＷ６３２を生成するための骨格ベクターとして使用された。

【０４０４】

ｐＣＷ５７１の構築

ＣｔＦＡＴＢ－３ ｃＤＮＡのヌクレオチド４８５～７８４に対応するベニバナ遺伝子ＣｔＦＡＴＢ－３の領域と同一である３００ｂｐの配列（配列番号５０）が、化学的に合成され、製造業者の取扱説明書に従って、ｐＥＮＴＲ／Ｄ ｔｏｐｏ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中に挿入され、ｐＣＷ５６９と表されたＧａｔｅｗａｙ侵入ク

143

ローンを生成した。
ヌクレオチド４２７～１１８２に対応するＣｔＦＡＤ２－２のｃＤＮＡの７５６ｂｐの断片（配列番号４９）は、合成され、発育中のベニバナ種子から単離されたＲＮＡからのＲＴ－ＰＣＲによって増幅された。このプライマーはそれぞれ、Ｄ２８－ＰｓｔＩ－５（５’－ＣＣＴＧＣＡＧＧＴＡＣＣＡＡＴＧＧＣＴＣＧＡＣＧＡＣＡＣＴＧ－３’）（配列番号１５７）およびＤ２８－ＡｓｃＩ－３（５’－ＣＧＧＣＧＣＧＣＣＴＴＣＡＣＣＴＣＣＴＣＡＴＣＴＴＴＡＴＣＣ－３’）（配列番号１５８）であった。プライマーは、５’ＰｓｔＩおよび３’ＡｓｃＩ制限酵素部位を含み、それによって、増幅された断片をｐＣＷ５６９の対応する部位中に挿入することができ、ｐＣＷ５７０を生成した。このベクターは、組み換え部位ＡｔｔＬ１およびＡｔｔＬ２によって隣接された１０８０ｂｐの断片として、ＣｔＦＡＴＢおよびＣｔＦＡＤ２－２遺伝子からの融合領域を含んだ。ついで、２コピーのこのＦＡＴＢ－ＦＡＤ２－２断片が、ｐＸＺＰ４１０中に挿入され、供給者の取扱説明書に従ってＬＲクロナーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＵＳＡ）を使用して、２番目のコピーを１番目のコピーに挿入した。得られたプラスミドｐＣＷ５７１は、種子中においてＣｔＦＡＴＢおよびＣｔＦＡＤ２－２遺伝子の発現を減少させるためにｈｐＲＮＡを生成するために、種子特異的な方法で逆方向反復領域を転写するための亜麻リニンプロモーターを有した。

【０４０５】

ｐＣＷ６０３の構築

２つの介在するイントロンとともに逆方向反復のＣｔＦＡＴＢ－ＣｔＦＡＤ２－２断片を含むｐＣＷ５７１からのＤＮＡ断片は、ＳｐｅＩで切断され、ＤＮＡポリメラーゼのＫｌｅｎｏｗ　Ｉ断片を使用して平滑化され、ｐＣＷ６００のＥｃｏＲＶ部位に連結されて、ｐＣＷ６０３を生成した。この構築物ｐＣＷ６０３は、ベニバナの種子中において、ＡｔＯｌｅｏｓｉｎプロモーターの制御下でｈｐＲＮＡを発現し、ＣｔＦＡＴＢおよびＣｔＦＡＤ２－２の発現を減少させることができた。

【０４０６】

ｐＣＷ５８１の構築

ｐＣＷ５７１に関しては、ＣｔＦＡＤ６のｃＤＮＡのヌクレオチド４５１～７５０に対応するＣｔＦＡＤ６の２９０ｂｐの断片およびＣｔＦＡＴＢの３００ｂｐの断片から作製されるＤＮＡの５９０ｂｐの断片（配列番号５１）が、化学的に合成され、ｐＥＮＴＲ／Ｄ　ｔｏｐｏ中に挿入されて、ｐＣＷ５７９を生成した。ｐＣＷ５７０に関して上述のように、ＣｔＦＡＤ２－２の７８０ｂｐの断片は、ｐＣＷ５７９のＡｓｃＩ部位中にクローン化されて、ｐＣＷ５８０を生成した。この構築物は、隣接する組み換え部位ＡｔｔＬ１およびＡｔｔＬ２とともに、１３７０ｂｐのＤＮＡ断片として、ＣｔＦＡＴＢ、

144

ＣｔＦＡＤ６、およびＣｔＦＡＤ２－２遺伝子の順番で結合された配列を含む侵入クローンベクターであった。次いで、２コピーのこのＦＡＴＢ－ＦＡＤ６－ＦＡＤ２－２断片が、ＬＲクロナーゼを使用して、逆方向反復としてｐＸＺＰ４１０中に挿入され、ｐＣＷ５８１を生成した。この構築物ｐＣＷ５８１は、逆方向反復に作動可能に連結された亜麻リニンプロモーターを有するバイナリーベクターであり、発育中のベニバナ種子の転写時に、細胞は、ＣｔＦＡＴＢ、ＣｔＦＡＤ６、およびＣｔＦＡＤ２－２遺伝子の発現を減少させるためにｈｐＲＮＡを発現することができた。

【０４０７】

ｐＣＷ６０２の構築

２つの介在するイントロンとともに、逆方向反復の結合されたＣｔＦＡＴＢ－ＣｔＦＡＤ６－ＣｔＦＡＤ２－２領域を含むＤＮＡ断片は、ｐＣＷ５７１から酵素的にＮｏｔ１で切断され、Ｋｌｅｎｏｗ　Ｉ断片を使用して平滑化され、次いで、ｐＣＷ６００のＥｃｏＲＶ部位に連結されて、ｐＣＷ６０２を生成した。リニンプロモーターを用いることを除いては同じ設計および遺伝子断片を有したｐＣＷ５８１とは対照的に、ｐＣＷ６０２は、ＡｔＯｌｅｏｓｉｎプロモーターの制御下でＣｔＦＡＴＢ－ＣｔＦＡＤ６－ＣｔＦＡＤ２－２配列を有した。

【０４０８】

ｐＣＷ６３１およびｐＣＷ６３２の構築

リニンプロモーターは、種子中においてｈｐＲＮＡを発現するのに有用であったが、ｐＣＷ５７１およびｐＣＷ５８１はともに、カナマイシン耐性を付与した選択可能なマーカーを有した。予備のベニバナ形質転換実験において、外植体がカナマイシンに十分に影響を受けなかったことを観察した。したがって、ｐＣＷ５７１およびｐＣＷ５８１のカナマイシン耐性カセットは、選択可能なマーカー遺伝子としてハイグロマイシン耐性カセットに置き換えられた。ｅｎＣＵＰプロモーター：ハイグロマイシン：ｎｏｓ３’ポリアデニル化領域からなるハイグロマイシン耐性遺伝子は、ｐＣＷ２６５からＳｐｅＩ－ＡｖｒＩＩ制限消化で切断され、ｐＣＷ５７１およびｐＣＷ５８１において、カナマイシン耐性カセットを置き換えるために使用されて、それぞれ、ｐＣＷ６３１および６３２を生成した。

【０４０９】

要約すると、ベニバナ形質転換のこの第１のセットに使用された構築物は、以下の主要要素を含んだ。

ベクタープロモーター逆方向反復での遺伝子断片

pCW631	リニン	CtFAD2-2およびCtFATB
pCW632	リニン	CtFAD2-2、CtFAD6、およびCtFATB
pCW602	AtOleosin	CtFAD2-2、CtFAD6、およびCtFATB
pCW603	AtOleosin	CtFAD2-2およびCtFATB

【０４１０】
これらの構築物は、アグロバクテリウム株ＡＧＬ１中に導入され、実施例１に記載されるように、ベニバナを形質転換するために使用され、以下の通りの結果を得た。

【０４１１】
実施例１１．遺伝子サイレンシング構築物によるベニバナの形質転換

遺伝的構築体は、接木を使用して再生された芽を救助するアグロバクテリウムによる方法を使用して、ベニバナ変種Ｓ３１７の切除された子葉および胚軸を形質転換するために使用された（Ｂｅｌｉｄｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１）。非形質転換台木（以下、T_0 植物と称される）上に生育している３０を超える独立して形質転換された芽は、ベクターｐＣＷ６０３に対して再生され、実施例１に記載されるように、成熟するまで生育させた。

T_0 ベニバナ若枝におけるＴ－ＤＮＡの組み込みは、Ｂｅｌｉｄｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１１）によって記載されるように、Ｔ－ＤＮＡベクターに特異的なプライマーを使用するＰＣＲによって確認された。特定の形質転換に使用されるＴ－ＤＮＡを欠いていることが見出され、組織培養中の再生中、ハイグロマイシン選択からの「エスケープ」であると推定されるほとんどの植物が廃棄された。しかしながら、一部は、形質転換された植物との比較のための「ヌル」植物または陰性対照として維持された。これらの対照植物は、組織培養中において形質転換された材料と同じ条件、接木、および温室条件下で処理された。

【０４１２】
実施例１２．トランスジェニックベニバナの種子油の脂肪酸組成の分析

脂肪酸分析が、以下の通りに、形質転換されたベニバナ植物から得られた個々のT_1 種子において行われた。Ｓ３１７遺伝的背景において、ｐＣＷ６０３で形質転換された３０の個々のT_0 植物が、温室中で生育され、自家受精して、種子を生成した。それぞれのT_0 植物からの単一の種子の頭部から１０個もの成熟種子が、実施例１に記載されるように、ＧＣ分析を使用して、脂質組成について分析された。ｐＣＷ６０３で形質転換されたベニバナＳ３１７の種子からの脂肪酸組成分析の結果を表１３中に要約する。それぞれの形質転換したT_0 ベニバナ植物が、Ｔ－ＤＮＡに対してヘテロ接合であり、そのため、T_1 種子の分離集団を生じることが予測されたため、それぞれの植物からの５～１０個の種子の分析が、いくつかのヌル（分離個体）の種子を含み得ることが予測された。そのようなヌル分離個体の種子は、同じ植物からの形質転換された種子と同じ種子頭部内で生育し、発育したため、この実験において良好な陰性対照であった。表１３中のデータから見られ得るように、（全脂肪酸含量の重量％として）８７％を超えるオレイン酸のレベルが、３０の生成された株のうちの６つの独立した株（

株９、１２、１４、２０、３４、および３６）において観察された。多くの形質転換された種子は、８７～９１．７％の範囲のオレイン酸含量を有し、２．１５～５．９％のリノール酸レベルおよび２．３２～３．４５％のパルミチン酸レベルを有した。種子中の他の脂肪酸レベルは、非形質転換対照とは有意に異ならなかった。ｐＣＷ６０３で形質転換されたT_1 ベニバナ種子において観察された最大のオレイン酸含量が、９１．７％であったのに対して、非形質転換Ｓ３１７対照種子およびヌル分離個体の種子では、約７７％であった。とりわけ、種子脂質はまた、１６：０のレベルで有意に減少し、４．５％から２．３％まで下がって減少した。ＴＬＣプレート上で精製される場合、種子油のＴＡＧ画分の脂肪酸のプロファイルは、種子から抽出された総脂質のものとは有意に異ならなかった。

【０４１３】
２つの測定基準が、ベニバナ種子油中において最も重要な脂肪酸を占めるベニバナ種子の全脂肪酸組成に基づいて計算された。これらは、オレイン酸不飽和率（ＯＤＰ）およびパルミチン酸＋リノール酸対オレイン酸の比率（ＰＬＯ）であった。これらは、それぞれの種子について計算され、このデータを表１３中に示す。野生型種子（Ｓ３１７、非形質転換）およびヌル分離個体は、約０．１５００のＯＤＰ比および約０．２８３０のＰＬＯ値を有した。ｐＣＷ６０３由来のＴ－ＤＮＡで形質転換された種子は、ＯＤＰおよびＰＬＯ値の有意な減少を示した。６つの独立した事象から生じた１３個の種子は、０．１未満のＰＬＯ値および０．０６未満のＯＤＰを有した。１つの形質転換された株は、０．０２２９のＯＤＰおよび０．０５１４のＰＬＯを有した。

【０４１４】
１つのエリート株の成熟した個々の単一種子、ｐＣＷ６０３の株９で形質転換されたＳ３１７、および非形質転換親Ｓ３１７を、ＬＣ－ＭＳの脂質全代謝物の分析に供した。これらの分析は、ＡｔＯｌｅｏｓｉｎｐ：ＣｔＦＡＴＢ－ＣｔＦＡＤ２－２　ＲＮＡｉヘアピン構築物で形質転換された種子由来の油が、ＴＡＧおよびＤＡＧ組成を劇的に変化させたことを明らかに示した（図１１および１２）。ＴＡＧ（５４：３）のレベルの明らかな増加およびＴＡＧ（５４：５）の減少があり、これらはそれぞれ、主に、１８：１／１８：１／１８：１－ＴＡＧ（トリオレイン）および１８：１／１８：２／１８：２－ＴＡＧであった。ＬＣ－ＭＳによって分析された種子のうち、ＴＡＧ中のトリオレイン（＝５４：３）含量は、ＲＮＡｉサイレンシング株由来の種子に対して最高のオレイン酸レベル（９０％超、表１４）で６４．６％（モル％）と同量であり、それに対して、非形質転換（Ｓ－３１７）親は、４７％～５３％の範囲のトリオレインレベルを有した。２番目に豊富なオレイン酸塩を含有するＴＡＧは、１８：０／１８：１／１８：１であり、そ

の後に、１８：１／１８：１／１８：２が続いた。また、これらのベニバナ油の間で最も明らかな違いは、ＤＡＧ脂質クラスにおいて見られ得た。ＤＡＧ（３６：１）レベルは、親種子と比較して、形質転換された種子由来の種子油で２倍であったが、ＤＡＧ（３６：４）は、最大１０％減少した。ＤＡＧ（３６．１）は、主に、１８：０／１８：１－ＤＡＧであり、ＤＡＧ（３６：４）は、１８：２／１８：２－ＤＡＧ（ジリノール酸塩）である。全ＴＡＧのレベルが、全ＤＡＧよりも約１００倍高かったため、種子脂質中のＤＡＧは、わずかに微量な成分であった（表１５）。

【０４１５】

トランスジェニック植物の生育および形態

ｐＣＷ６０３由来のＴ－ＤＮＡを含有するＴ$_0$ベニバナ形質転換細胞は、Ｔ－ＤＮＡに対して分離したＴ$_1$種子を生成し、一組のホモ接合体、ヘテロ接合体、およびヌル分離個体を得た。これらのサブ集団の比は、メンデル遺伝学により期待されるように、Ｔ$_0$植物におけるＴ－ＤＮＡ挿入事象の数および連結に応じて異なった。したがって、それぞれのＴ$_0$植物由来のＴ$_1$種子が、独立して分析された。個々の種子からの脂質プロファイルの分析は、単一種子頭部がヌルおよびトランスジェニック事象の両方を含んだことを明らかに示した。

【表１３】

Ｓ－３１７背景においてｐＣＷ６０３のＴ－ＤＮＡで形質転換された個々のベニバナＴ１種子の脂質の脂肪酸組成　それぞれの脂肪酸のレベル（％）を全脂肪酸含量のパーセンテージとして表した。

試料*	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	PLO**	ODP***
S317 (1)	4.60	1.47	75.69	0.69	16.49	0.00	0.31	0.26	0.27867	0.1789
S317 (2)	4.64	1.47	77.02	0.68	15.09	0.00	0.32	0.28	0.25620	0.1638
S317 (3)	4.56	1.38	76.20	0.68	16.14	0.00	0.32	0.26	0.27161	0.1748
S317 (4)	4.61	1.57	76.41	0.69	15.64	0.00	0.34	0.26	0.26506	0.1699
S317 (5)	4.55	1.51	77.90	0.69	14.28	0.00	0.33	0.25	0.24176	0.1549
ヌル (1)	4.77	2.10	78.07	0.85	13.82	0.00	0.38	0.00	0.23815	0.1504
ヌル (2)	4.93	1.96	76.02	0.89	15.55	0.00	0.38	0.28	0.26942	0.1698
ヌル (3)	5.59	2.22	75.15	0.92	15.68	0.00	0.45	0.00	0.28302	0.1726
ヌル (4)	4.61	1.65	78.52	0.78	13.58	0.00	0.35	0.28	0.23163	0.1474
ヌル (5)	5.57	2.93	78.10	0.93	11.96	0.00	0.51	0.00	0.22445	0.1328
TS603.12 (5)	2.56	2.05	91.73	0.84	2.15	0.00	0.37	0.29	0.05136	0.0229
TS603.09 (4)	2.32	1.87	91.45	0.74	3.09	0.00	0.20	0.34	0.05911	0.0326
TS603.09 (5)	2.66	2.43	91.41	0.78	2.45	0.00	0.27	0.00	0.05587	0.0261
TS603.09 (1)	2.42	2.08	91.17	0.74	3.02	0.00	0.23	0.33	0.05972	0.0321
TS603.36 (1)	2.65	2.40	91.01	0.67	2.25	0.00	0.45	0.32	0.05379	0.0241
TS603.36 (2)	2.73	1.77	90.53	0.69	3.36	0.00	0.36	0.32	0.06728	0.0358
TS603.20 (4)	2.94	1.31	89.63	0.86	4.58	0.00	0.31	0.34	0.08393	0.0486
TS603.34 (4)	3.21	2.55	89.62	0.89	2.92	0.00	0.48	0.32	0.06847	0.0316
TS603.14 (2)	2.99	1.74	89.31	0.88	4.39	0.00	0.35	0.34	0.08257	0.0468
TS603.09 (3)	2.90	1.75	89.00	0.83	5.52	0.00	0.00	0.00	0.09465	0.0584
TS603.34 (5)	3.36	2.23	88.92	0.85	3.89	0.00	0.43	0.32	0.08151	0.0419
TS603.34 (2)	3.24	1.76	88.74	1.02	4.51	0.00	0.37	0.37	0.08725	0.0483
TS603.23 (2)	4.47	1.74	79.45	0.86	12.86	0.00	0.35	0.28	0.21810	0.1393
TS603.28 (4)	4.99	2.08	79.45	0.94	12.14	0.00	0.41	0.00	0.21554	0.1325
TS603.28 (1)	4.73	2.31	79.42	0.85	12.26	0.00	0.43	0.00	0.21390	0.1337
TS603.28 (5)	5.04	1.96	79.37	0.97	12.66	0.00	0.00	0.00	0.22301	0.1376
TS603.28 (2)	4.95	2.16	79.33	0.88	12.29	0.00	0.39	0.00	0.21728	0.1341
TS603.15 (2)	4.55	1.73	79.31	0.89	12.90	0.00	0.36	0.27	0.21995	0.1399
TS603.06 (4)	4.60	1.73	79.25	0.88	12.93	0.00	0.33	0.28	0.22121	0.1403
TS603.15 (1)	4.50	2.11	79.11	0.84	12.79	0.00	0.39	0.26	0.21860	0.1392
TS603.12 (1)	4.28	1.33	79.08	0.76	13.82	0.21	0.27	0.26	0.22380	0.1507
TS603.06 (2)	4.63	2.24	79.08	0.78	12.58	0.00	0.42	0.27	0.21765	0.1373
TS603.09 (2)	4.39	1.72	78.80	0.73	13.30	0.19	0.34	0.30	0.22453	0.1462
TS603.23 (1)	4.56	2.11	78.63	0.79	13.24	0.00	0.39	0.27	0.22648	0.1442
TS603.17 (1)	4.43	1.49	78.47	0.74	13.92	0.37	0.31	0.26	0.23386	0.1540
TS603.15 (4)	4.67	1.99	78.41	0.84	13.48	0.00	0.36	0.26	0.23138	0.1467
TS603.28 (3)	4.89	1.67	78.31	0.88	13.29	0.31	0.35	0.31	0.23208	0.1479
TS603.34 (1)	4.65	2.13	77.75	0.83	13.58	0.35	0.41	0.30	0.23441	0.1519
TS603.23 (3)	4.59	1.70	77.28	0.85	14.63	0.31	0.36	0.28	0.24866	0.1620
TS603.15 (5)	4.69	1.64	77.23	0.97	14.85	0.00	0.35	0.27	0.25302	0.1613

*この変換で標識化された試料：ＴＳ６０３．１２（５）は、ベクターｐＣＷ６０３、事象１２、種子５で形質転換された植物を表す。「ヌル」として標識化された試料は、植物形質転換において非形質転換エスケープとしてＰＣＲ分析を介して決定された。

**ＰＬＯの測定基準は、（１６：０＋１８：２）／１８：１として計算された

***ＯＤＰの測定基準は、（１８：２＋１８：３）／（１８：１＋１８：２＋１８：３）として計算された

TS603.14 (1)	3.21	1.51	88.65	0.88	5.05	0.00	0.34	0.37	0.09310	0.0539
TS603.20 (3)	3.29	1.39	88.44	0.98	5.90	0.00	0.00	0.00	0.10391	0.0625
TS603.12 (2)	3.00	1.63	88.42	0.75	5.60	0.00	0.31	0.30	0.09722	0.0595
TS603.20 (2)	3.45	1.66	88.36	0.99	5.54	0.00	0.00	0.00	0.10175	0.0590
TS603.20 (1)	3.30	1.46	88.16	0.89	5.53	0.00	0.33	0.31	0.10021	0.0590
TS603.14 (5)	3.45	1.66	87.43	0.87	5.88	0.00	0.36	0.35	0.10673	0.0630
TS603.14 (4)	3.37	1.84	87.36	0.88	5.81	0.00	0.39	0.35	0.10509	0.0624
TS603.36 (4)	3.24	2.21	87.33	0.67	5.60	0.00	0.42	0.30	0.10117	0.0602
TS603.36 (3)	3.42	2.33	86.82	0.71	5.68	0.00	0.45	0.32	0.10491	0.0614
TS603.14 (3)	3.58	1.61	86.50	0.86	6.74	0.00	0.36	0.35	0.11931	0.0723
TS603.12 (4)	3.68	1.39	85.46	0.92	7.97	0.00	0.29	0.30	0.13624	0.0853
TS603.12 (3)	3.55	2.06	85.01	0.74	8.02	0.00	0.35	0.27	0.13609	0.0862
TS603.23 (5)	4.93	1.75	82.63	1.04	8.75	0.00	0.41	0.31	0.16561	0.0958
TS603.17 (5)	4.68	1.57	82.06	0.70	10.37	0.00	0.33	0.31	0.18339	0.1122
TS603.17 (4)	4.41	1.31	81.94	0.68	11.11	0.00	0.28	0.28	0.18940	0.1194
TS603.24 (3)	4.24	2.17	81.70	0.68	10.28	0.00	0.42	0.27	0.17772	0.1118
TS603.24 (5)	4.48	2.18	81.15	0.69	10.56	0.00	0.41	0.27	0.18541	0.1152
TS603.24 (4)	4.39	2.16	80.94	0.70	10.88	0.00	0.41	0.25	0.18869	0.1185
TS603.23 (4)	4.38	2.01	80.86	0.82	11.23	0.00	0.40	0.29	0.19312	0.1220
TS603.24 (2)	4.50	2.39	80.70	0.68	10.79	0.00	0.44	0.26	0.18946	0.1180
TS603.17 (3)	4.60	1.75	80.65	0.68	11.69	0.00	0.35	0.27	0.20203	0.1266
TS603.24 (1)	4.28	2.01	80.54	0.70	11.53	0.00	0.40	0.27	0.19632	0.1252
TS603.17 (2)	4.40	1.75	80.33	0.73	11.92	0.00	0.35	0.28	0.20316	0.1292
TS603.06 (3)	4.38	1.60	80.22	0.88	12.31	0.00	0.34	0.28	0.20803	0.1330
TS603.06 (5)	4.52	1.47	80.11	0.84	12.50	0.00	0.29	0.27	0.21245	0.1350
TS603.15 (3)	4.65	2.01	79.94	0.85	11.92	0.00	0.38	0.26	0.20720	0.1297
TS603.34 (3)	4.77	2.44	79.79	0.86	11.42	0.00	0.45	0.28	0.20281	0.1252
TS603.36 (5)	4.92	2.43	79.78	0.68	11.24	0.00	0.44	0.26	0.20258	0.1235
TS603.06 (1)	4.49	1.89	79.63	0.82	12.61	0.00	0.38	0.29	0.21495	0.1368

【表１４】

149

単一種子の全脂質中の脂肪酸組成（全脂肪酸の%）

試料	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1
S317 種子１	5.21	2.35	77.36	0.88	14.20	0.00	0.00	0.00
S317 種子２	5.08	3.04	77.20	0.80	13.88	0.00	0.00	0.00
S317 種子３	5.00	2.65	78.89	0.78	12.67	0.00	0.00	0.00
TS603.9 種子１	3.76	3.07	87.93	0.91	4.34	0.00	0.00	0.00
TS603.9 種子２	3.33	2.98	89.97	0.93	2.80	0.00	0.00	0.00
TS603.9 種子４	3.61	4.28	88.20	0.87	3.05	0.00	0.00	0.00
TS603.9 種子５	3.61	3.13	88.45	0.92	3.38	0.00	0.50	0.00
TS603.9 種子６	4.45	3.04	85.50	0.90	5.62	0.00	0.51	0.00

【表１５】

ＴＡＧおよびＤＡＧの相対量

試料	TAG/DAG比
S317 種子１	60.4
S317 種子２	84.7
S317 種子３	71.2
TS603.9 種子１	117.5
TS603.9 種子２	124.2
TS603.9 種子４	97.8
TS603.9 種子５	96.5
TS603.9 種子６	95.9

【０４１６】

一部のトランスジェニック株由来の種子が、植物形態および生育速度を観察するために、温室中での制御条件下で（温度、土壌、最適な散水および施肥であるが、天然光下で）生育された。形質転換されたＴ$_1$植物とそれらのヌル分離個体の同胞種との間で表現型の違いは、観察されなかった。形質転換された種子は、非形質転換種子と同じ速度で発芽し、同じ早期実生の成長速度（成長力）を有する実生を得た。植え付けらた種子のすべてが土着し、十分に施肥された植物に生育した。ＤＮＡは、Ｔ$_1$世代の個々の植物からの本葉の先端から調製され、ＰＣＲ分析が、ヌルおよびトランスジェニック植物の比率を決定するために行われた。予想通りに、ヌル分離個体が特定された。

【０４１７】

この表現型分析は、ｐＣＷ６０３のＴ－ＤＮＡで形質転換され、導入遺伝子を発現するベニバナ植物がヌル分離個体と比較して、いかなる有害作用も被らなかったことを示した。

【０４１８】

Ｔ２世代のベニバナ種子を、油組成について試験した。高いレベルのオレイン酸を有するいくつかの植物由来の種子（表１３）は、第二世代の種子（Ｔ２種子）を生成する成熟植物に生育した。これらの種子は、成熟したとき、収穫され、それらの油の脂肪酸組成について分析された。このデータを表１６中に示す。Ｔ１種子は、オレイン酸が最大約９２％を示したが、Ｔ２種子は、オレイン酸が９４．６％に達した。Ｔ１世代に対してＴ２世代で観察された増加は、導入遺伝子のホモ接合性によるものであり得るか、または単に多数の株が分析されたためであり得る。

【０４１９】

サザンブロットハイブリダイゼーション分析が、それぞれの形質転換された株においてＴ－ＤＮＡ挿入数を決定するために使用され、単一のＴ－ＤＮＡ挿入を有する株が選択される。Ｔ２種子の油含量は、同じ遺伝的背景の

150

制御された非形質転換種子において、同じ条件下で生育したものとあまり有意差がない。

【０４２０】

ｐＣＷ６３１由来のＴ－ＤＮＡで形質転換されたベニバナ種子の分析

ｐＣＷ６３１で形質転換されたベニバナ変種Ｓ－３１７のＴ１種子が、それらの脂肪酸組成について同様に分析された。表１７は、これらの種子についてのデータならびにＯＤＰおよびＰＬＯの測定基準を示す。これらの種子の脂質中のオレイン酸含量は、最大９４．１９％であった。最高レベルのオレイン酸を有する種子ＴＳ６３１－０１　Ｔ１（２１）のパルミチン酸含量は２．４３％であり、ＯＤＰは０．０２０３であり、ＰＬＯは０．０４２３であった。これらの分析は、Ｓ－３１７遺伝的背景のベニバナに形質転換された場合、ｐＣＷ６０３の構築物であるｐＣＷ６３１のヘアピンＲＮＡ構築物が、一般に、より高いオレイン酸レベルを生成したことを示した。この観察は、ｐＣＷ６３１で使用されたリニンプロモーターが、ｐＣＷ６０３に使用されたＡｔＯｌｅｏｓｉｎプロモーターと比較して、より強力なもしくはより良好な発現の時期、または両方の組み合わせを有するヘアピンＲＮＡを発現したことを示した。

【０４２１】

ｐＣＷ６３１由来のＴ－ＤＮＡで形質転換されたベニバナ変種Ｓ－３１７のＴ２種子は、ＧＣによって分析された。最大９４．９５％のオレイン酸レベルが、０．０１のＯＤＰおよび０．０３５のＰＬＯとともに観察された。

【０４２２】

構築物ｐＣＷ６３２およびｐＣＷ６０２由来のＴ－ＤＮＡで形質転換されたベニバナ種子および植物が、ｐＣＷ６０３およびｐＣＷ６３１で形質転換された種子および植物に対するものと同じ方法で分析された。ｐＣＷ６３２で形質転換されたベニバナ変種Ｓ－３１７のＴ１種子のＧＣ分析は、０．０１０２のＯＤＰおよび０．０３６２のＰＬＯとともに、最大９４．８８％のオレイン酸レベルを示した。それらのＴ２種子は、０．０１６４のＯＤＰおよび０．０４５２のＰＬＯとともに、最大９３．１４％のオレイン酸を示した。

【０４２３】

より大量のベニバナ種子油の抽出

ＴＳ６０３－２２．６と表されたホモ接合型トランスジェニック株由来のＴ４種子が収穫され、全種子油は、実施例１に記載されるような、ソックスレー装置を使用して抽出された。抽出された油のアリコートが、ＧＣによって分析された（表１８）。合計６４３グラムの油が回収された。抽出物２、３、５、および６はプールされたが、抽出物４、７、および８は、別々のロット中にプールされた。これらの混合物は、ＧＣによって、脂肪酸組成についてさらに分析された。このデータを表１８中に

示す。

【０４２４】

実施例１３．さらなる遺伝子サイレンシング構築物の設計および調製

実施例１０～１２に記載された結果に基づいて、他の遺伝子サイレンシング構築物を以下の通りに調製して、ベニバナ種子油のオレイン酸含量を増加させ、ＯＤＰまたはＰＬＯ比を減少させた。これらの遺伝子サイレンシング構築物は、非ベニバナ源、ならびにベニバナ源由来の異なるプロモーターを合わせて、ベニバナＦＡＤ２－２、ＦＡＴＢ－３、およびＦＡＤ６遺伝子発現において最大限の減少を達成することと、ＦＡＤ２－２に加えて１つを超えるＦＡＤ２遺伝子をさらにサイレンシングすることを含んだ。これらの構築物は、、内因性ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子の不活性変形を有するベニバナの変種、例えば、Ｓ－３１７、Ｃｉａｎｏ－ＯＬ、およびＬｅｓａｆｆ４９６を形質転換するために使用された。

【０４２５】

ｐＣＷ７００の構築

この植物バイナリー発現ベクターは、内因性ＣｔＦＡＴＢおよびＣｔＦＡＤ２－２の発現を減少させるために、ヘアピンＲＮＡを生成する、１つのプロモーターというよりもむしろ、ベニバナ種子中において異なるが、重複する発現パターンを有する２つの外来（非ベニバナ）プロモーターを有する。２つのプロモーターは、ＡｔＯｌｅｏｓｉｎプロモーターおよび亜麻リニンプロモーターであり、２つのｈｐＲＮＡ発現カセットは、同じＴ－ＤＮＡ分子中にある。このベクターは、リニンプロモーターならびにＣｔＦＡＤ２－２およびＣｔＦＡＴＢのサイレンシングのためのｈｐＲＮＡコード領域を有するｐＣＷ６３１由来のｈｐＲＮＡ遺伝子発現カセットの制限消化によって構築され、それをｐＣＷ６０３由来のＴ－ＤＮＡに挿入し、そのようにして、これらの２つのベニバナ遺伝子に対してヘアピンＲＮＡをコードする構築物を生成する。この構築物は、Ｌｅｓａｆｆ４９６、Ｃｉａｎｏ－ＯＬ、およびＳ－３１７等のベニバナ変種を形質転換するために使用される。

【表１６】

Ｓ－３１７背景においてｐＣＷ６０３由来のＴ－ＤＮＡで形質転換された個々のベニバナＴ２種子の脂質の脂肪酸組成　それぞれの脂肪酸のレベル（％）を全脂肪酸含量のパーセンテージとして表した。

試料	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	ODP	PLO
TS603-22.1 T2 (2)	2.7	0.9	93.5	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0306	0.059281
TS603-22.6 T2 (14)	3.1	1.5	93.4	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0222	0.054943
TS603-08.2(3)	2.7	0.9	93.4	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0306	0.059851
TS603-22.05(5) T2	2.3	1.6	93.4	2.5	0.2	0.0	0.0	0.0267	0.051234
TS603-22.6 T2 (15)	3.0	1.2	93.3	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0261	0.057723
TS603-22.5 T2 (11)	2.2	1.2	93.3	2.3	0.0	0.3	0.4	0.0285	0.048123
TS603-22.6 T2 (8)	2.9	1.2	93.3	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0265	0.057514
TS603-22.5 T2 (12)	2.2	1.3	93.3	2.3	0.0	0.3	0.4	0.0289	0.047835
TS603-22.6 T2 (7)	3.1	1.3	93.2	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0265	0.059228
TS603-22.4 T2 (8)	2.1	1.8	93.2	2.0	0.0	0.3	0.3	0.0254	0.044186
TS603-22.6 T2 (11)	2.9	1.2	93.1	2.5	0.0	0.1	0.0	0.0271	0.057755
TS603-22.3 T2 (1)	2.5	1.2	93.1	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0335	0.060295
TS603-22.5 T2 (14)	2.1	1.3	93.1	2.6	0.0	0.2	0.4	0.0318	0.050656
TS603-22.5 T2 (16)	2.3	1.5	93.0	2.3	0.0	0.3	0.3	0.0283	0.049621
TS603-22.5 T2 (18)	2.3	1.0	93.0	2.8	0.0	0.2	0.4	0.0341	0.05407
TS603-22.5 T2 (15)	2.0	0.9	92.9	3.0	0.0	0.3	0.5	0.0381	0.054149
TS603-22.6 T2 (12)	3.0	1.2	92.9	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0294	0.061518
TS603-22.05(3) T2	2.5	1.0	92.9	3.3	0.1	0.2	0.0	0.0350	0.061372
TS603-22.6 T2 (18)	2.9	0.8	92.9	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0349	0.06593
TS603-22.6(3)	2.7	0.7	92.9	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0383	0.067112
TS603-22.8 T2 (4)	2.6	1.2	92.9	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0358	0.063416
TS603-22.6 T2 (17)	2.7	0.8	92.9	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0375	0.067028
TS603-22.1 T2 (1)	2.7	1.1	92.8	3.1	0.2	0.0	0.0	0.0334	0.062312
TS603-22.4 T2 (11)	2.2	1.4	92.6	2.7	0.0	0.3	0.4	0.0340	0.053189
TS603-22.4 T2 (12)	2.1	1.4	92.6	2.9	0.0	0.3	0.4	0.0355	0.054077

試料	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	ODP	PLO
TS603-22.6 T2 (1)	2.4	1.0	93.5	2.8	0.1	0.0	0.0	0.0239	0.049028
TS603-22.4 T2 (2)	2.2	1.5	94.3	1.8	0.0	0.0	0.1	0.0200	0.042739
TS603-22.6 T2 (20)	2.2	1.1	94.2	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0256	0.048622
TS603-22.05(4) T2	2.2	1.4	94.2	2.0	0.0	0.1	0.0	0.0212	0.044211
TS603-22.8 T2 (1)	2.1	1.1	93.9	2.5	0.2	0.1	0.0	0.0263	0.04839
TS603-22.6 T2 (10)	2.8	1.0	93.9	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0223	0.052359
TS603-22.6 T2 (6)	2.9	1.1	93.9	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0214	0.052318
TS603-22.05(1) T2	2.2	1.3	93.8	2.2	0.1	0.2	0.0	0.0240	0.04783
TS603-22.6 T2 (13)	2.9	1.2	93.8	1.7	0.0	0.2	0.0	0.0185	0.049564
TS603-22.6 T2 (16)	2.9	0.9	93.8	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0249	0.055517
TS603-22.4 T2 (1)	2.5	1.5	93.7	1.9	0.1	0.1	0.0	0.0204	0.046933
TS603-22.6(1)	2.7	1.2	93.7	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0241	0.052497
TS603-22.3 T2 (5)	2.5	1.1	93.6	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0278	0.05449
TS603-08.2(4)	2.2	0.8	93.6	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0355	0.05861
TS603-22.6 T2 (9)	2.9	1.2	93.5	2.2	0.0	0.2	0.0	0.0235	0.054815
TS603-22.6 T2 (19)	2.9	1.1	93.5	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0245	0.055483
TS603-22.4 T2 (3)	2.4	1.0	93.5	2.8	0.1	0.0	0.0	0.0299	0.056044

153

試料	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	ODP	PLO
TS603-19.02(5) T2	2.4	1.9	91.4	4.1	0.1	0.2	0.0	0.0445	0.070234
TS603-10.02(2) T2	2.7	1.5	91.2	4.4	0.1	0.1	0.0	0.0480	0.077276
TS603-22.5 T2 (13)	2.4	1.5	91.2	4.1	0.0	0.2	0.4	0.0489	0.071172
TS603-19.02(4)	2.6	1.8	91.1	4.3	0.2	0.1	0.0	0.0471	0.075467
TS603-22.4 T2 (6)	2.4	1.6	91.0	4.1	0.0	0.3	0.4	0.0488	0.07045
TS603-34.4 T2 (2)	2.7	1.7	90.8	4.4	0.1	0.1	0.0	0.0487	0.078563
TS603-27.5 T2 (1)	2.7	1.3	90.7	4.3	0.0	0.3	0.3	0.0511	0.076932
TS603-19.02(2) T2	2.7	1.7	90.6	4.8	0.0	0.2	0.0	0.0532	0.083056
TS603-22.5 T2 (17)	2.7	1.7	90.5	4.0	0.0	0.4	0.4	0.0480	0.074387
TS603-08.2(5)	3.0	1.1	90.5	5.3	0.0	0.0	0.0	0.0583	0.091395
TS603-19.2 T2 (17)	2.6	1.8	90.5	4.2	0.0	0.3	0.3	0.0504	0.074894
TS603-19.2 T2 (10)	2.5	2.2	90.4	3.9	0.0	0.4	0.3	0.0464	0.070963
TS603-34.3 T2 (3)	2.8	1.5	90.2	5.2	0.1	0.1	0.0	0.0575	0.088097
TS603-19.2 T2 (19)	2.5	2.3	90.2	4.0	0.0	0.3	0.3	0.0481	0.073009
TS603-09.8 T2 (1)	2.8	1.3	90.0	5.0	0.0	0.3	0.3	0.0589	0.086178

試料	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	ODP	PLO
S317 (1)	5.57	2.93	78.10	11.96	0.00	0.51	0.00	0.1531	0.22445 5
S317 (2)	4.77	2.10	78.07	13.82	0.00	0.38	0.00	0.1770	0.23815 0.24176
S317 (3)	4.55	1.51	77.90	14.28	0.00	0.33	0.25	0.1865	3 0.23163
S317 (4)	4.61	1.65	78.52	13.58	0.00	0.35	0.28	0.1764	4

試料	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0	C20:1	C22:0	ODP	PLO
TS631-02 T1 (2)	4.54	0.08	1.61	80.87	12.07	0.31	0.26	0.25	0.1525	0.2054
TS631-02 T1 (3)	4.47	0.08	2.07	80.64	11.90	0.37	0.24	0.23	0.1506	0.2030
TS631-02 T1 (4)	4.60	0.09	1.83	80.24	12.51	0.29	0.22	0.22	0.1586	0.2132
TS631-02 T1 (9)	4.44	0.09	1.74	80.20	12.76	0.31	0.23	0.24	0.1619	0.2144
TS631-02 T1 (6)	4.47	0.10	1.60	79.99	13.06	0.30	0.25	0.24	0.1664	0.2191
TS631-02 T1 (10)	4.39	0.09	1.82	79.90	12.98	0.33	0.24	0.24	0.1655	0.2174
TS631-02 T1 (12)	4.31	0.09	1.52	79.87	13.48	0.27	0.26	0.19	0.1720	0.2227
TS631-02 T1 (8)	4.46	0.09	1.57	79.58	13.47	0.30	0.30	0.23	0.1730	0.2254
TS631-02 T1 (5)	4.72	0.08	1.45	79.05	13.87	0.32	0.27	0.24	0.1789	0.2351

【表１７】

154

S－３１７背景においてｐＣＷ６３１由来のＴ－ＤＮＡで形質転換された個々のベニバナＴ２種子の脂質の脂肪酸組成分析　それぞれの脂肪酸のレベル（％）を全脂肪酸含量のパーセンテージとして表した。

FAME識別番号	試料	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0	C20:1	C22:0	ODP	PLO
899	TS631-02 T1 (2)	4.54	0.08	1.61	80.87	12.07	0.31	0.26	0.25	0.1525	0.2054
900	TS631-02 T1 (3)	4.47	0.08	2.07	80.64	11.90	0.37	0.24	0.23	0.1506	0.2030
901	TS631-02 T1 (4)	4.60	0.09	1.83	80.24	12.51	0.29	0.22	0.22	0.1586	0.2132
906	TS631-02 T1 (9)	4.44	0.09	1.74	80.20	12.76	0.31	0.23	0.24	0.1619	0.2144
903	TS631-02 T1 (6)	4.47	0.10	1.60	79.99	13.06	0.30	0.25	0.24	0.1664	0.2191
907	TS631-02 T1 (10)	4.39	0.09	1.82	79.90	12.98	0.33	0.24	0.24	0.1655	0.2174
909	TS631-02 T1 (12)	4.31	0.09	1.52	79.87	13.48	0.27	0.26	0.19	0.1720	0.2227
905	TS631-02 T1 (8)	4.46	0.09	1.57	79.58	13.47	0.30	0.30	0.23	0.1730	0.2254
902	TS631-02 T1 (5)	4.72	0.08	1.45	79.05	13.87	0.32	0.27	0.24	0.1789	0.2351

【表１８】

FAME識別番号	試料	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0	C20:1	C22:0	ODP	PLO
916	TS631-01 T1 (21)	2.43	0.13	1.06	94.19	1.56	0.24	0.39	0.27	0.0203	0.0423
912	TS631-01 T1 (17)	2.37	0.10	1.17	93.73	1.87	0.23	0.34	0.19	0.0230	0.0452
913	TS631-01 T1 (18)	2.57	0.11	0.97	93.27	2.56	0.22	0.38	0.19	0.0305	0.0550
897	TS631-01 T1 (16)	2.50	0.10	1.04	93.24	2.35	0.21	0.37	0.18	0.0247	0.0521
910	TS631-03 T1 (1)	2.42	0.11	1.60	93.00	2.01	0.30	0.34	0.23	0.0250	0.0476
921	TS631-04 T1 (1)	2.49	0.11	1.31	92.93	2.34	0.27	0.34	0.20	0.0275	0.0521
895	TS631-01 T1 (14)	2.54	0.11	1.07	92.82	2.56	0.25	0.37	0.20	0.0316	0.0549
917	TS631-01 T1 (22)	2.66	0.17	1.16	92.75	2.68	0.28	0.42	0.30	0.0334	0.0576
918	TS631-03 T1 (2)	2.36	0.11	2.02	92.64	1.92	0.36	0.32	0.25	0.0242	0.0463
914	TS631-01 T1 (19)	2.68	0.12	1.23	92.30	2.84	0.28	0.34	0.21	0.0345	0.0598
898	TS631-02 T1 (1)	2.99	0.12	1.21	90.79	4.06	0.26	0.32	0.26	0.0483	0.0777
915	TS631-01 T1 (20)	3.74	0.00	1.07	90.67	4.14	0.00	0.00	0.38	0.0456	0.0869
919	TS631-03 T1 (3)	4.23	0.10	1.50	81.70	11.92	0.30	0.29	0.27	0.1494	0.1976

油のソックスレー抽出および油の脂肪酸プロファイル

抽出番号	乾燥種子の重量(g)	粉末重量(g)	回収した油(g)	油含量(%)	脂肪酸組成物(重量%)							
					16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:0
抽出物-1	223.00	219.89	68.14	30.99	2.7	0.1	1.3	92.7	2.6	0.0	0.3	0.3	0.1
抽出物-2	233.24	232.71	64.68	27.79	2.8	0.1	1.4	91.9	3.0	0.0	0.3	0.3	0.1
抽出物-3	240.07	238.72	72.37	30.32	3.1	0.1	1.5	91.9	2.8	0.0	0.3	0.3	0.1
抽出物-4	231.59	229.96	66.69	29.00	3.0	0.1	1.5	91.4	3.6	0.0	0.3	0.3	0.1
抽出物-5	220.22	219.54	62.64	28.53	2.9	0.1	1.3	92.1	3.0	0.0	0.3	0.3	0.1
抽出物-6	288.97	288.20	77.75	26.98	2.7	0.1	1.5	92.3	2.8	0.0	0.3	0.3	0.1
抽出物-7	241.10	239.73	71.96	30.02	2.9	0.1	1.4	91.9	3.2	0.0	0.3	0.2	0.1
抽出物-8	243.68	242.90	67.04	27.60	2.9	0.1	1.6	91.4	3.4	0.0	0.3	0.3	0.1
抽出物-9	321.26	320.76	92.15	28.73	3.3	0.1	1.6	89.6	4.8	0.0	0.3	0.3	0.1
混合物													
抽出物-2/3/5/6					2.9	0.1	1.4	92.0	2.9	0.0	0.3	0.3	0.2
抽出物-4/7/8					2.9	0.1	1.5	91.3	3.4	0.0	0.3	0.3	0.2

【０４２６】

ｐＣＷ７０１－ｐＣＷ７１０の構築

ベニバナ種子中において最適活性を有することを期待されるベニバナ由来のプロモーターは、発現された遺伝子の上流および下流ＤＮＡ領域についての正確な配列情報を提供するＤＮＡ配列決定技術を使用して単離される。実施例２～６に記載される、先行の結果は、ＣｔＦＡＤ２－１遺伝子がベニバナにおける種子発育時に高度に発現されることを示す。したがって、この遺伝子のプロモーター領域は、ベニバナ種子中において、効率的な導入遺伝子発現を活発にするための卓越した候補である。実施例６に示されるように、ＣｔＦＡＤ２－２は、ＣｔＦＡＤ２－１が突然変異によって不活性化された遺伝的背景において活性であった。したがって、ＣｔＦＡＤ２－２のプロモーターを、ベニバナにおいて使用して、他の遺伝子の間でＣｔＦＡＤ２－２活性を標的とするヘアピンＲＮＡの発現を活発にする。ベニバナ種子中において導入遺伝子の発現に有用な他のプロモーター要素には、オレオシン（ＣｔＯｌｅｏｓｉｎ）および種子貯蔵タンパク質、例えば、２Ｓおよび１１Ｓタンパク質（Ｃｔ２ＳおよびＣｔ１１Ｓ）に対する遺伝子の上流部分に内因性（すなわち、ベニバナ）プロモーター要素が含まれる。ＣｔＦＡＤ２－１、ＣｔＯｌｅｏｓｉｎ、Ｃｔ２Ｓ、およびＣｔ１１Ｓのプロモーター要素を、ベニバナゲノム配列に基づく標準的なＰＣＲベースの手法を使用して

単離し、植物バイナリー発現ベクターに組み込む。これらのプロモーター要素を使用して、構築物ｐＣＷ７０１－ｐＣＷ７１０中、あるいは、同じまたは異なるｈｐＲＮＡ遺伝子を発現する他の非ベニバナプロモーター、例えば、ｐＣＷ６０２、ｐＣＷ６０３、ｐＣＷ６３１、またはｐＣＷ６３２と組み合わせて、ｈｐＲＮＡサイレンシング分子を発現する。異なるプロモーターとのｈｐＲＮＡ遺伝子の組み合わせはまた、形質転換した植物を個々の遺伝子と交配することによっても生成され、そこでは一般的に、ｈｐＲＮＡ遺伝子は連結されない。

【０４２７】

ＣｔＦＡＤ２－１プロモーターを単離するために、ＣｔＦＡＤ２－１翻訳開始ＡＴＧコドンの約３０００ｂｐ上流のゲノムＤＮＡ断片が、ＰＣＲベースの手法を使用して単離され、ｐＣＷ６０３およびｐＣＷ６０２由来のＡｔＯｌｅｏｓｉｎプロモーターに置き換えるために使用され、そうすることで、それぞれ、構築物ｐＣＷ７０１およびｐＣＷ７０２を生成する。

【０４２８】

ＣｔＦＡＤ２－２プロモーターを単離するために、ＣｔＦＡＤ２－２翻訳開始ＡＴＧコドンの約３０００ｂｐ上流のゲノムＤＮＡ断片が、ＰＣＲベースの手法を使用して単離され、その断片を使用して、ｐＣＷ６０３およびｐＣＷ６０２由来のＡｔＯｌｅｏｓｉｎプロモーターに置き換え、そうすることで、それぞれ、構築物ｐＣＷ７０３およびｐＣＷ７０４を生成する。

【０４２９】

ＣｔＯｌｅｏｓｉｎ－１プロモーターを単離するために、ＣｔＯｌｅｏｓｉｎ翻訳開始ＡＴＧコドンの約１５００塩基対の上流のゲノムＤＮＡ断片を、ＰＣＲベースの手法を使用して単離し、ｐＣＷ６０３およびｐＣＷ６０２由来のＡｔＯｌｅｏｓｉｎプロモーターに置き換えるために使用され、それぞれ、構築物ｐＣＷ７０５およびｐＣＷ７０６を生成する。

【０４３０】

Ｃｔ２Ｓプロモーターを単離するために、Ｃｔ２Ｓ翻訳開始ＡＴＧコドンの約１５００塩基対の上流のゲノムＤＮＡ断片が、単離され、ｐＣＷ６０３およびｐＣＷ６０２由来のＡｔＯｌｅｏｓｉｎプロモーターに置き換えるために使用され、そうすることによって、それぞれ、ベクターｐＣＷ７０７およびｐＣＷ７０８を生成する。

【０４３１】

Ｃｔ１１Ｓプロモーターを単離するために、Ｃｔ１１Ｓ開始ＡＴＧの約１５００塩基対の上流のゲノムＤＮＡ断片が、ＰＣＲベースの手法を使用して、ベニバナのゲノムＤＮＡから単離され、ｐＣＷ６０３およびｐＣＷ６０２由来のＡｔＯｌｅｏｓｉｎプロモーターに置き換えるために使用され、そうすることによって、それぞれ、ベクターｐＣＷ７０９およびｐＣＷ７１０を生成する。

【０４３２】

157

これらのベクターのそれぞれを、実施例１に記載されるように、ベニバナ変種に形質転換する。

【０４３３】

実施例１４．ベニバナ変種の野外性能

一連のベニバナの非形質転換変種およびアクセッションを、Ｎｅｗ Ｓｏｕｔｈ Ｗａｌｅｓ州のＮａｒｒａｂｒｉに位置する野外農場で、２０１１～２０１２年の夏に生育させた。５ｍ×３ｍの野外プロット内で、Ｎａｒｒａｂｒｉ領域内で一般に見られる重粘土に、種子を植え付けた。生育から４週間後に一度かんがいしたことを除いては、植物は天然光および降雨にさらした。成熟種子が収穫され、約５０個の種子の試料が、種子油中の脂質含量および脂肪酸組成について分析された。様々な変種およびアクセッションの種子油中のオレイン酸含量を表１９および図１３に示す。

【０４３４】

野外実験からのデータは、驚くほど、観察された範囲に及ぶ範囲内において、ベニバナ種子のオレイン酸含量の範囲があったことを示した。中でも注目すべきは、「高オレイン酸」として記載され、少なくとも７０％のオレイン酸を有する種子油を提供することが既に報告されていた様々なアクセッション、例えば、Ｃｉａｎｏ－ＯＬが、わずかに約４２～４６％のオレイン酸を生成したことであった。リノール酸のレベルは、以前の報告に基づいて予測されたものよりもはるかに高かった。対照的に、例えば、アクセッションＰＩ－５６０１６９８およびＰＩ－５６０１６９等の高オレイン酸含量を得ると報告されていた他のアクセッションが、実際には、野外条件下で種子油中の高オレイン酸レベル（６０％～７６％）を生成した。いくつかのアクセッションにおいて予測されたものよりもかなり低いオレイン酸レベルの理由は、ｏｌ対立遺伝子以外、例えば、温度感受性のあるｏｌ１１対立遺伝子のようなＣｔＦＡＤ２－１対立遺伝子の存在、および２０１１～１２年の時期においてあまり理想的ではなかった生育条件と関連すると考えられた。野外で生育されたベニバナから得られた種子におけるさらなる脂肪酸分析が、いくつかのアクセッションのオレイン酸含量において観察された変種を確認するために行われた。

【表１９】

158

野外で生育されたベニバナ変種の脂質の脂肪酸組成

ID	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1
PI 613463	5.3	< 0.1	5.5	9.1	78.8	0.1	0.6	0.2
PI 537677	6.3	0.2	2.3	10.3	79.9	0.1	0.3	0.2
PI 537645	7.8	0.2	2.2	10.5	78.0	0.1	0.4	0.2
PI 572433	6.4	0.1	2.5	10.7	78.7	0.2	0.4	0.2
PI 572472	6.3	0.2	2.4	11.1	78.7	0.2	0.4	0.2
RC 1002 L	6.8	0.2	2.7	11.5	77.3	0.2	0.4	0.2
PI 537701	6.7	0.2	2.3	11.6	77.8	0.2	0.4	0.2
CC1485-3-1-1-1-1	7.8	0.2	2.2	11.6	76.9	0.2	0.4	0.2
PI 560163	7.0	0.2	1.9	11.7	77.8	0.1	0.4	0.2
PI 451958	7.1	0.2	2.7	11.8	77.1	< 0.1	0.4	0.2
PI 306609	6.6	0.2	2.5	12.0	77.3	0.2	0.4	0.2
PI 451950	6.6	0.1	2.2	12.4	77.5	0.1	0.4	0.2
PI 537705	6.6	0.2	2.6	13.1	76.3	0.2	0.4	0.2
PI 413718	7.1	0.2	2.9	13.4	74.9	0.2	0.6	0.2
PI 560161	7.1	0.2	2.1	14.4	75.0	0.1	0.4	0.2
PI 560180	6.5	0.2	2.0	18.3	71.5	0.3	0.4	0.2
PI 401477	5.8	0.2	2.3	36.8	53.2	0.2	0.5	0.2
PI 537712	6.5	0.2	2.5	40.5	48.5	0.2	0.5	0.2
PI 537695	6.0	0.2	2.3	41.9	47.9	0.2	0.5	0.3
CIANO-OL	6.9	0.3	1.9	42.9	46.5	0.2	0.5	0.3
PI 538779	6.6	0.2	2.1	43.2	46.2	0.2	0.4	0.3
シノナリア	6.0	0.2	2.1	43.5	46.6	0.2	0.4	0.2
(Sinonaria)								
PI 401479	5.9	0.2	2.1	48.2	41.7	0.3	0.5	0.4
PI 560166	5.7	0.2	2.3	55.0	35.0	0.1	0.5	0.3
PI 401474	5.5	0.3	1.9	59.3	30.6	0.4	0.6	0.6
PI 560177	5.1	0.2	1.9	60.7	30.3	0.2	0.4	0.3
PI 603207	5.6	0.2	2.0	65.2	25.0	0.2	0.5	0.3
PI 560167	5.8	0.2	1.6	65.9	24.8	0.2	0.4	0.3
PI 560174	5.9	0.3	1.8	67.6	22.6	0.3	0.5	0.3
PI 603208	5.4	0.2	2.3	68.3	21.7	0.2	0.6	0.3
PI 538025	5.3	0.2	2.3	68.5	21.6	0.3	0.4	0.3
PI 560168	5.9	0.2	1.8	68.5	21.8	0.3	0.5	0.3
PI 560169	5.6	0.2	1.9	71.8	18.6	0.2	0.5	0.3
PI 577808	5.3	0.2	2.0	75.0	15.5	0.3	0.5	0.3
PI 612967	5.4	0.2	1.8	76.3	14.5	0.2	0.4	0.3

【０４３５】

この実験はまた、野外で生育された植物から得られた種子油中のオレイン酸のレベルが、野外での優良のアクセッションに対するものでさえ、一般に、温室で生育された植物からのものよりも約５～１０％低かったことを示した。この理由は、野外で生育する条件が温室内でのものほど理想的ではなかったからだと考えられた。

【０４３６】

さらなる実験において、ベニバナ栽培品種Ｓ３１７の植物は、種子油の脂肪酸組成を比較するために、野外または温室のいずれかで生育された。野外条件が、２０１１～１２年の時期と比較して、生育時期により好ましいものであったが、温室で生育された植物からの１．２０２ｇと比べると、野外で生育された種子からの２０個の種子の重量は、０．９７７ｇであった。それぞれの群の１８～２０個の種子は、ＧＣ分析によって脂肪酸組成について分析された。野外で生育された種子のオレイン酸レベルは、７４．８３～８０．６５の範囲に及び、７８．５２＋／－１．５３の平均（＋／１標準偏差）を有したのに対し、温室で生育された種子の範囲は、７５．１５～７８．４４であり、７６．３３＋／－１．００の平均を有した。他の脂肪酸は、表２０中のレベルで存在した。

【表２０】

159

野外または温室で生育したＳ３１７種子油の脂肪酸組成

試料	16:0	16:1 Δ9z	18:0	18:1 Δ9z	18:1 Δ11z	18:2 Δ9z Δ12z	18:3 Δ9z Δ12z Δ15z	20:0	20:1 Δ11z	22:0
野外で生育										
平均	4.90	0.00	2.40	78.52	0.75	12.5	0.00	0.47	0.20	0.21
標準偏差	0.24	0.00	0.31	1.53	0.28	1.66	0.00	0.05	0.13	0.13
温室で生育										
平均	4.80	0.04	2.72	76.33	0.72	14.2	0.00	0.46	0.23	0.25
標準偏差	0.1	0.04	0.3	1.00	0.17	1.06	0.00	0.12	0.06	0.06

【０４３７】

実施例１５．他のベニバナ変種への導入遺伝子の交配

ベニバナ変種は、例えば、Ｍｕｎｄｅｌ　ａｎｄ　Ｂｅｒｇｍａｎ（２００９）に記載されるような確立した方法を使用して、手作業で交配される。上述の構築物を含む最良の形質転換した株、具体的には、単一のＴ－ＤＮＡ挿入のみを含む形質転換された株が選択され、ベニバナの他の変種の、異なる構築物で形質転換されない、または既に形質転換された、最適な農業生産力を有する植物で交差される。例えば、４または５回の戻し交配に対して、反復親と戻し交配する反復ラウンドを使用して、最適な農業生産力の遺伝的背景において、所望の構築物（複数を含む）に対してホモ接合である自殖植物が生成される。

マーカー利用選抜は、実施例７に記載されるような、ｏｌ対立遺伝子に対する完全なマーカーの使用等の繁殖プロセスに使用され得る。

【０４３８】

実施例１６．人工のマイクロＲＮＡによって媒介された遺伝子サイレンシングによる種子油組成の修飾

マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）は、内因性遺伝子の活性を調節する植物および動物の両方に対して内因性である一種の２０～２４ヌクレオチド（ｎｔ）の調節小ＲＮＡ（ｓＲＮＡ）である。修飾されたｍｉＲＮＡ前駆体ＲＮＡ（人工のｍｉＲＮＡ前駆体）のトランスジェニック発現は、内因性遺伝子をサイレンシングする近年開発されたＲＮＡベースの配列特異的な戦略を表す。人工のｍｉＲＮＡ前駆体を作製するためのｍｉＲＮＡ前駆体配列内のいくつかのヌクレオチドの置換は、前駆体のステムループ内でマッチおよびミスマッチの位置が影響を受けないままである限り、ｍｉＲＮＡの反復発生に影響を及ぼさないことが示されている。

【０４３９】

ＣＳＩＲＯソフトウェアパッケージＭａｔｃｈＰｏｉｎｔ（ｗｗｗ．ｐｉ．ｃｓｉｒｏ．ａｕ／ＲＮＡｉ）（Ｈｏｒｎ　ａｎｄ　Ｗａｔｅｒｈｏｕｓｅ，２０１０）は、アラビドプシスゲノムが独特であり、それ故に、人工のｍｉＲＮＡとして発現される場合、非標的遺伝子（オフ遺伝子ターゲティング）のサイレンシングを生じる可能性が低いアラビドプシスＦＡＤ２、ＦＡＴＢ、およびＦＡＥ１遺伝子において、特異的な２１量体配列を特定

160

するために使用された。一意の２１量体配列が、３つの遺伝子のそれぞれに対して選択され、それぞれの場合に、２１量体は、対応する遺伝子の転写物の領域に対して完全に相補的（アンチセンス）であった。人工のｍｉＲＮＡ前駆体分子が、Ａ．サリアナａｒａ－ｍｉＲ１５９ｂの前駆体配列に基づいて、それぞれに対して設計された。それぞれの場合に、ｍｉＲ１５９ｂの前駆体配列は、アンチセンス２１量体配列に適合するようにその幹に修飾された。前駆体ＲＮＡのうちの１つをコードする３つの構築物がそれぞれ、種子特異的なＦＰ１プロモーターの制御下で作製され、バイナリー発現ベクターにクローン化され、ｐＪＰ１１０６、ｐＪＰ１１０９、およびｐＪＰ１１１０と表される構築物を生成した。

【０４４０】

これらの構築物は、別々に、エレクトロポレーションによってＡ．ツメファシエンス株ＡＧＬ１に形質転換され、形質転換された株は、フローラルディップ法によって、遺伝的構造体をＡ．サリアナ（生態型Ｃｏｌｕｍｂｉａ）中に導入するために使用された（実施例１）。処理された植物からの種子（T_1 種子）は、形質転換された実生を選択するために、３．５ｍｇ／ＬのＰＰＴを添加したＭＳ培地上に平面培養し、これらを土壌に移して、確立されたT_1 トランスジェニック植物を定着させた。これらのT_1 植物の大部分は、導入された遺伝的構築物に対してヘテロ接合であることが予測された。トランスジェニック植物由来のT_2 種子は、成熟時に収集され、それらの脂肪酸組成について分析された。

これらのT_2 植物は、遺伝的構築物に対してホモ接合であった株、ならびにヘテロ接合であったものを含んだ。ホモ接合型T_2 植物は、自家受精して、T_3 種子を生成し、T_3 子孫植物は、これらの種子から得られ、同様に、これらを使用して、T_4 子孫植物を得た。

したがって、これは、子孫植物の三世代にわたる遺伝子サイレンシングの安定性の分析を可能にした。

【０４４１】

T_2、T_3、およびT_4 種子ロットから得られた種子油の脂肪酸プロファイルは、実施例１に記載されるように、ＧＣによって分析された。ＦＡＤ２ベースの導入遺伝子の作用によって生じたΔ１２－デサチュラーゼ活性の変化が、種子油プロファイルにおけるオレイン酸の量の増加として見られた。種子脂肪酸合成中のΔ１２－デサチュラーゼ活性の累積的影響を評価するための関連方法は、それぞれの種子油に対するオレイン酸不飽和率（ＯＤＰ）パラメーターを計算することを通じて、以下の式：ＯＤＰ＝１８：２の%＋１８：３の%／１８：１の%＋１８：２の%＋１８：３の%を使用することによって得られた。野生型アラビドプシス種子油は、一般に、約０．７０～０．７９のＯＤＰ値を有し、これは、種子内での脂肪酸合成中に形成された７０%～７９%の１８：１が、その後、まず第一に、Δ１２－デサチュラーゼの

161

作用によって１８：２を生成し、次いで、１８：３へのさらなる不飽和化によって、多価不飽和Ｃ１８脂肪酸に変換されたことを意味した。したがって、ＯＤＰパラメーターは、内因性Δ１２－デサチュラーゼ活性のレベルにおけるＦＡＤ２遺伝子サイレンシングの程度を判定するのに有用である。

【０４４２】

ｐＪＰ１１０６構築物（ＦＡＤ２標的）で形質転換されたT$_2$ 種子におけるＣ１８：１$^{\Delta 9}$（オレイン酸）のレベルは、１４．０％±０．２の野生型Ｃ１８：１の平均レベルと比較して、３０のトランスジェニック事象において、３２．９％～６２．７％の範囲であった。植物選択可能なマーカー（ＰＰＴ）の分離比（３：１）によって決定された、単一の導入遺伝子挿入を有した高度にサイレンシングされた株（植物ＩＤ－３０）は、次世代（T$_3$）に転送された。４６．０％～６３．８％の範囲の、５７．３±５．０％の平均を有する、同様に高いレベルの１８：１$^{\Delta 9}$が、T$_3$ 種子において観察された。それに続く世代において、T$_4$ 種子はまた、６１％～６５．８％の範囲の、６３．３±１．０６％の平均を有する、同様に高いレベルの１８：１$^{\Delta 9}$を示した。T$_2$ トランスジェニック種子油の全ＰＵＦＡ含量（１８：２＋１８：３）は、６．１％～３８％の範囲であったが、ホモ接合株ＩＤ－３０由来の種子油の全ＰＵＦＡ含量は、さらに減少し、４．３～５．７％の範囲であった。対照のアラビドプシス生態型Ｃｏｌｕｍｂｉａ種子油は、０．７５～０．７９の範囲のＯＤＰ値を有し、これは、発育中の種子中において生成した７５％超のオレイン酸が、その後、１８：２または１８：３に変換されたことを意味した。対照的に、アラビドプシスのｆａｄ２－１突然変異体由来の種子油は、０．１７のＯＤＰ値を有し、これは、ｆａｄ２－１突然変異体によるΔ１２－不飽和化の７５％の減少を示した。ＯＤＰ値は、T$_2$ トランスジェニック種子油では０．０８～０．４８、T$_3$ 種子油では０．０７～０．３２、T$_4$ 種子油では０．０６～０．０８の範囲であり、それに対して、対照のアラビドプシス種子油では０．７５の値であった。トランスジェニック株におけるＯＤＰ値の劇的な減少は、人工のマイクロＲＮＡアプローチを使用して、内因性ＦＡＤ２遺伝子の効率的なサイレンシングを明らかに示した。この実験はまた、三世代にわたる遺伝子サイレンシングの安定性も示した。遺伝子サイレンシングの同様の程度が、それらの対応する遺伝子を下方調節するその他の２つの構築物で見られた。

【０４４３】

人工のマイクロＲＮＡを使用するこの研究において観察されたＦＡＤ２遺伝子サイレンシングの程度および１８：１$^{\Delta 9}$の量（６３．３±１．０６％）は、十分に特徴付けられたＦＡＤ２－２突然変異体におけるものよりも高く（５９．４％）、ＦＡＤ２をサイレンシングした株

162

は、ヘアピンＲＮＡアプローチ（５６．９±３．６％）およびヘアピン－アンチセンスアプローチ（６１．７±２．０％）を使用した。ａｍｉＲＮＡを使用したＦＡＤ２をサイレンシングした種子油中の１８：２＋１８：３の平均含量％は、４．８±０．３７％であり、これは、以前に報告されたＦＡＤ２－２突然変異体のものよりも低く（７．５±１．１％）、ＦＡＤ２をサイレンシングした株は、ヘアピン－アンチセンスアプローチ（７．２±１．４％）を使用した。したがって、これらのデータは、サイレンシングの程度で人工のマイクロＲＮＡの利点、ならびに、子孫の世代にわたるサイレンシングの安定性を示した。

【０４４４】

実施例１７．油におけるステロール含量および組成のアッセイ

オーストラリアにおいて商業的供給源から購入された１２の植物油試料からの植物ステロールが、実施例１に記載されるように、Ｏ－トリメチルシリルエーテル（ＯＴＭＳｉ－エーテル）誘導体としてＧＣおよびＧＣ－ＭＳ分析によって特徴付けられた。ステロールは、保持データ、質量スペクトルの解釈、ならびに文献および実験の標準質量スペクトルデータによる比較によって特定された。ステロールは、５β（Ｈ）－コラン－２４－オールの内部標準の使用によって定量化された。特定されたステロールのうちのいくつかの基本的な植物ステロール構造および化学構造を、図１４および表２１に示す。

【表２１】

特定されたステロールのＩＵＰＡＣ／系統名

ステロール番号	一般名（複数を含む）	IUPAC / 系統名
1	コレステロール	コレスト-5-エン-3β-オール
2	ブラシカステロール	24-メチルコレスタ-5,22E-ジエン-3β-オール
3	カリナステロール / 24-メチレンコレステロール	24-メチルコレスタ-5,24(28)E-ジエン-3β-オール
4	カンペステロール / 24-メチルコレステロール	24-メチルコレスト-5-エン-3β-オール
5	カンペスタノール / 24-メチルコレスタノール	24-メチルコレスタン-3β-オール
7	Δ5-スチグマステロール	24-エチルコレスタ-5,22E-ジエン-3β-ol
9	エルゴスト-7-エン-3β-オール	24-メチルコレスト-7-エン-3β-オール
11	エブリコール	4,4,14-トリメチルエルゴスト a-8,24(28)-ジエン-3β-オール
12	β-シトステロール/ 24-エチルコレステロール	24-エチルコレスト-5-エン-3β-オール
13	Δ5-アベナステロール / イソフコステロール	24-エチルコレスタ-5,24(28)Z-ジエン-3β-オール
19	Δ7-スチグマステロール / スチグマスト-7-エン-3b-オール	24-エチルコレスト-7-エン-3β-オール
20	Δ7-アベナステロール	24-エチルコレスタ 7,24(28)-ジエン-3β-オール

【０４４５】

分析された植物油は、ゴマ（セサマムインディカム（Ｓｅｓａｍｕｍ ｉｎｄｉｃｕｍ））、オリーブ（オレアユーロパエア）、ヒマワリ（ヘリアンサスアナス）、ヒマシ（リシヌスコミュニス）、ナタネ（ブラシカナプス）、ベニバナ（カルタムスチンクトリウス）、ピーナッツ（アラキスヒポゲア）、亜麻（リナムウシタチシマム）、および大豆（グリシンマックス）由来であった。油試料のすべてにわたって、減少する相対存在量で、主要

163

な植物ステロールは、β－シトステロール（全ステロール含量の２８～５５％の範囲）、Δ５－アベナステロール（イソフコステロール）（３～２４％）、カンペステロール（２～３３％）、Δ５－スチグマステロール（０．７～１８％）、Δ７－スチグマステロール（１～１８％）、およびΔ７－アベナステロール（０．１～５％）であった。いくつかの他の副次ステロールが特定され、これらは、コレステロール、ブラシカステロール、カリナステロール、カンペスタロール、およびエブリコールであった。また、４つのＣ２９：２および２つのＣ３０：２ステロールも検出されたが、さらなる研究が、これらの副次成分の特定を完成させるのに必要とされる。さらに、いくつかの他の特定されないステロールが一部の油中に存在したが、それらの極めて低い存在量により、質量スペクトルはそれらの構造の特定を可能にするほど十分に強力ではなかった。

【０４４６】

減少する量のｍｇ／ｇ（油）として表されるステロール含量は、ナタネ油（６．８ｍｇ／ｇ）、ゴマ油（５．８ｍｇ／ｇ）、亜麻油（４．８～５．２ｍｇ／ｇ）、ヒマワリ油（３．７～４．１ｍｇ／ｇ）、ピーナッツ油（３．２ｍｇ／ｇ）、ベニバナ油（３．０ｍｇ／ｇ）、大豆油（３．０ｍｇ／ｇ）、オリーブ油（２．４ｍｇ／ｇ）、ヒマシ油（１．９ｍｇ／ｇ）であった。ステロール組成および全ステロール含量（％）を表２２に示す。

【０４４７】

種子油試料のすべてのうちで、主要な植物ステロールは、一般に、β－シトステロール（全ステロール含量の３０～５７％の範囲）であった。その他の主要なステロールの割合で様々な油があった：カンペステロール（２～１７％）、Δ５－スチグマステロール（０．７～１８％）、Δ５－アベナステロール（４～２３％）、Δ７－スチグマステロール（１～１８％）。異なる種に由来する油は、全く異なるプロファイルを有するものとは異なるステロールプロファイルを有した。ナタネ油は、最高比率のカンペステロール（３３．６％）を有したが、他の種の試料は、一般に、より低いレベル、例えば、ピーナッツ油中に最大１７％を有した。ベニバナ油は、比較的高い比率のΔ７－スチグマステロール（１８％）を有したが、このステロールは、通常、他の種の油中では低く、ヒマワリ油中で最大９％であった。それらは、それぞれの種において独特であったため、ステロールプロファイルは、それ故に、特定の植物または植物油の特定に役立てるために、そして、それらの純種または他の油による不純物の添加を確認するために使用することができる。

【０４４８】

２つの試料のヒマワリおよびベニバナのそれぞれが比較され、それぞれの場合において、一方は、種子の冷却圧縮によって生成され、未精製であったが、もう一方は、

164

冷却圧縮されず、精製された。いくつかの違いが観察されたが、油の２つの源は、同様のステロール組成および全ステロール含量を有し、加工および精製がこれらの２つのパラメーターにおいてあまり影響しなかったことを示唆した。試料の中のステロール含量は、３倍変化し、１．９ｍｇ／ｇ～６．８ｍｇ／ｇの範囲であった。ナタネ油は、最高のステロール含量を有し、ヒマシ油は、最低のステロール含量を有した。

【表２２】

アッセイした植物油のステロール含量および組成

ステロール番号*	ステロールの一般名	ゴマ	オリーブ	ヒマワリ	ヒマワリ冷却圧縮	トウゴマ	ナタネ	ベニバナ	ベニバナ冷却圧縮	ピーナッツ	亜麻（アマニ）	亜麻（アマニ）	大豆
1	コレステロール	0.2	0.8	0.2	0.0	0.1	0.3	0.2	0.1	0.2	0.4	0.4	0.2
	ブラシカステロール												
2	カンペステロール	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0
	カリナステロール /24-メチレンコレステロール												
3	カンペステロール /24-メチル	1.5	0.1	0.3	0.1	1.1	2.4	0.2	0.1	0.9	1.5	1.4	0.8
4	コレステロール	16.2	2.4	7.4	7.9	8.4	33.6	12.1	8.5	17.4	15.7	14.4	16.9
	カンペスタノール /24-メチル												
5	クレスタノール	0.7	0.3	0.3	0.1	0.9	0.2	0.8	0.8	0.3	0.2	0.2	0.7
6	C29:2*	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0	0.1	0.5	0.5	0.0	1.2	1.3	0.1
	Δ5-スチグマステロール												
7	エブリコール	6.4	1.2	7.4	7.2	18.6	0.7	7.0	4.6	6.9	5.1	5.8	17.6
8	未確認	0.5	1.3	0.7	0.6	0.8	0.7	0.7	1.3	0.4	0.7	0.6	1.3
	エルゴスト-7-												
9	エン-3β-オール	0.1	0.1	1.9	1.8	0.2	0.4	2.7	4.0	1.4	1.4	1.4	1.0
10	未確認	0.0	1.3	0.9	0.8	1.2	0.9	1.8	0.7	1.2	0.7	0.5	0.7

	全ステロール（mg/g（油））	5.8	2.4	4.1	3.7	1.9	6.8	3.2	3.0	3.2	4.8	5.2	3.0

C29：2*およびおよびC30：2*はそれぞれ、2つの二重結合を有するC29ステロールおよび2つの二重結合を有するC30ステロールを示す。

		1.6	1.8	4.1	4.4	1.5	1.0	1.9	2.9	1.2	3.5	3.3	0.9
11	エブリコール												
	β-シトステロール/24-エチルコレステロール	55.3	45.6	43.9	43.6	37.7	50.8	40.2	35.1	57.2	29.9	28.4	40.2
12	Δ5-アベナステロール/イソフコステロール	8.6	16.9	7.2	4.1	19.3	4.4	7.3	6.3	5.3	23.0	24.2	3.3
13	トリテルペノイドアルコール	0.0	2.4	0.9	1.1	0.0	0.0	1.6	1.9	0.0	0.0	0.0	0.9
14	トリテルペノイドアルコール	0.0	0.0	0.7	0.6	0.0	0.0	2.8	1.8	0.0	0.0	0.3	0.0
15	C29:2*	0.0	0.5	0.7	0.7	1.5	1.2	2.8	1.9	2.0	1.0	0.7	0.5
16	C29:2*	1.0	0.9	2.3	2.4	0.6	0.4	1.3	1.9	0.9	1.0	1.0	1.0
17	C30:2*	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
18	Δ7-スチグマステロール/スチグマスト-7-エン-3β-オール	2.2	7.1	9.3	10.9	2.3	0.9	10.5	18.3	1.1	7.9	8.7	5.6
19	Δ7-アベナステロール	1.3	0.1	4.0	3.6	0.6	0.2	2.0	4.7	0.7	0.4	0.4	0.6
20	未確認	0.7	7.1	0.9	0.8	0.0	0.4	0.3	0.4	0.0	3.0	3.6	0.0
21	未確認	0.3	0.0	0.3	0.9	0.0	0.0	1.2	1.3	0.2	0.1	0.0	0.3
22	未確認	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.1	0.3	0.2	0.2	0.1	0.2	0.5
23	未確認	0.0	3.1	0.9	1.3	0.6	0.4	0.2	0.4	0.7	1.7	1.9	0.8
24	未確認	0.9	0.4	0.3	0.5	0.3	0.1	0.5	0.7	0.3	0.1	0.1	0.6
25	C30:2	2.2	6.0	4.6	5.7	1.4	0.6	1.0	1.2	1.2	1.2	1.1	5.2
26	未確認	0.0	0.4	0.4	0.3	0.3	0.2	0.1	0.2	0.3	0.1	0.0	0.3
27	合計	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

【０４４９】

別々の分析が、温室で生成された対照種子（Ｓシリーズ）由来のベニバナ油、遺伝的に修飾された高オレイン酸種子（Ｔシリーズ）、および２つの市販のベニバナ油で行われた。いくつかの特徴が観察された（表２３）。第一に、対照種子と修飾された種子との間でステロールパターンの高度な類似性があり、第二に、市販のベニバナ油が別々のグループ分けされており、それ故に、有意に異なる植物ステロールプロファイルを有することが示されている。植物ステロールプロファイルのさらなる試験はまた、対照および修飾されたベニバナ種子試料からの植物ステロールプロファイル類似性を示した。

【０４５０】

広く記載される本発明の精神または範囲から逸脱することなく、特定の実施形態に示されるような本発明への種々の変更および／または改変がなされ得ることは、当業者に明らかであろう。したがって、本発明の実施形態は、すべての点で例示であって、制限的なものではないと考えられるべきである。

【０４５１】

本出願は、２０１２年４月２５日に出願された米国特許第ＵＳ６１／６３８，４４７号、および２０１２年９月１１日に出願されたオーストラリア特許第ＡＵ２０１２９０３９９２号からの優先権を主張し、これらはともに、参照により本明細書に組み込まれる。

【０４５２】

本明細書において論じられるおよび／または言及されたすべての刊行物は、その全体が本明細書に組み込まれる。

【０４５３】

本明細書に含まれた文書、法令、材料、装置、物品等のいかなる考察も、単に本発明についての文脈を提供する目的のためのものである。これらの事柄のいずれか、もしくはすべてが先行技術ベースの一部を形成するか、または本出願のそれぞれの特許請求の範囲の優先日以前に存在したため、本発明に関する分野における共通の一般的知識であったことの承認と解釈されるべきではない。

【表２３】

	24-エチルコレステロール					
13	Δ5-アベナステロール / イソフコステロール	24 エチルコレスタ-5,24(28)Z-ジエン-3β-オール	10.4	8.2	10.0	7.9	9.3
14	トリテルペノイドアルコール		1.6	1.9	1.4	1.2	1.4
15	トリテルペノイドアルコール		1.8	2.2	1.3	0.9	1.6
16	C29:2**		4.4	0.6	3.1	2.8	2.1
19	Δ7-スチグマステロール / スチグマスト-7-エン-3β-オール	24-エチルコレスト-7-エン-3β-オール	11.4	13.6	10.3	8.9	10.7
20	Δ7-アベナステロール ****	24-エチルコレスタ 7,24(28)Z-ジエン-3β-オール	6.1	5.7	5.3	3.4	4.9
21	unk***		0.2	0.4	0.2	0.5	0.4
22	unk***		0.9	1.0	1.1	1.1	0.9
23	unk***		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
24	unk***		0.2	0.6	0.9	1.5	0.9
25	unk***		0.9	0.6	0.3	1.0	0.5
26	C30:2		0.9	1.0	0.5	2.9	1.4
27	unk***		0.0	0.1	0.8	2.2	0.4
	合計		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	全ステロール (mg/g (油))		1.9	2.2	2.0	2.0	1.8

*ステロール番号は、ＧＣ痕跡を指す。**Ｃ２９：２およびおよびＣ３０：２はそれぞれ、２つの二重結合を有するＣ２９ステロール、およびＣ３０ステロールを示す。***ｕｎｋは、未確認を示す。****仮同定。
Ｓ３１７試料は、未修飾種対照であり、ＴＳ試料は、高オレイン酸を修飾したベニバナ油試料である。

ベニバナ種子油試料のステロール組成（全ステロールの%）および含量（ｍｇ／ｇ）

ステロール番号*	一般名（複数を含む）	IUPAC / 系統名	P2589 S317(1)	P2590 S317(2)	P2591 TS603.9.2 T1	P2592 TS603.9.4 T1	P2593 TS603.9.5 T1
1	コレステロール	コレスト-5-エン-3β-オール	0.5	0.6	0.5	3.0	1.1
2	ブラシカステロール	24-メチルコレスタ-5,22E-ジエン-3β-オール	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1
3	カリナステロール / 24-メチレンコレステロール / カンペステロール /	24-メチルコレスタ-5,24(28)E-ジエン-3β-オール	0.8	0.8	1.1	1.1	1.2
4	24-メチルコレステロール / カンペスタノール /	24-メチルコレスト-5-エン-3β-オール	10.5	11.6	11.0	11.8	11.8
5	24-メチルコレスタノール	24-メチルコレスタン-3β-オール	0.0	0.1	0.2	0.0	0.3
6	C29, 2**		0.9	0.8	0.2	7.2	0.4
7	Δ5-スチグマステロール	24-エチルコレスタ-5,22E-ジエン-3β-オール	0.7	0.9	0.8	0.8	0.6
8	unk***		1.8	2.1	2.3	2.1	2.0
9	エルゴスト-7-エン-3β-オール	24-メチルコレスト-7-エン-3β-オール	2.8	3.3	2.6	2.3	2.6
10	unk***		1.5	1.6	1.3	1.8	1.4
11	エブリコール	4,4,14-トリメチルエルゴスト a-8,24(28)-ジエン-3β-オール	1.7	2.2	5.0	2.8	2.6
12	β-シトステロール/	24-エチルコレスト-5-エン-3β-オール	35.9	37.0	35.7	36.2	37.5

[参考文献]

Abdullah et al. (1986) Biotech. 4:1087.

Almeida and Allshire (2005) TRENDS Cell Biol 15: 251-258.

Alonso et al. (2010) Green Chem. 12:1493-1513.

Ascherio and Willett (1997) Am. J. Clin. Nutr. 66: 1006S-1010S.

Bartholomew (1971) Temperature effects on the fatty acid composition of developing seeds in safflower, Carthamus tinctorius L.

Baumlein et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 225:459-467.

Baumlein et al. (1992) Plant J. 2:233-239.

Beclin et al. (2002) Current Biology 12:684-688.

Belide et al. (2011) Plant Methods 7:12.

Bergman et al. (2006) Crop Sci. 46:1818-1819.

Blacklock et al. (2010) J Biol Chem 285: 28442-28449.

Bligh and Dyer (1959) Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 37:911-7.

Bonanome and Grundy (1988). N. Engl. Med. 318: 1244-1248.

Brodersen and Voinnet (2006) Trends Genet. 22:268-280.

Broothaerts et al. (2005) Nature 433:629-633.

Broun et al. (1998) Plant J. 13:201-210.

Broun et al. (1999) Annu. Rev. Nutr. 19: 197-216.

Browse et al. (1989) Plant Physiol. 90:522-529.

Cahoon et al. (2003) Plant J. 34:671-683.

Chapman and Burke (2007) Evolution 61:1773-1780.

Cheng et al. (1996) Plant Cell Rep. 15:653-657.

Chung et al. (2006) BMC Genomics 7:120.

Clough and Bent (1998) Plant J. 16:735-743.

Comai et al. (2004) Plant J 37: 778-786.

Coutu et al. (2007) Transgenic Research 16:771-781 .Covello and Reed (1996) Plant Physiol. 111:223-226.

Dauk et al. (2007) Plant Science 173:43-49.

Dickey et al. (1994) Plant Cell 6:1171-1176.

Dougherty et al. (1995). Am. J. Clin. Nutr. 61:1120-1128.

Durrett et al. (2008) Plant J. 54:593-607.

Dyer et al. (2002) Plant Physiology 130:2027-2038.

Ellerstrom et al. (1996) Plant Mol. Biol. 32:1019-1027.

Endalew et al. (2011) Biomass and Bioenergy 35:3787-3809.

Falcone et al. (1994) Plant Physiol. 106:1453-1459 .Fenandez San Juan (1995). Alimentaria 33: 93-98.

Fernandez-Martinez et al. (1993) Euphytica 69: 115

169

-122.
Fofana et al. (2004) Plant Science 166:1487-1496.
Fujimura et al. (1985) Plant Tissue Culture Lett. 2:74.
Gamez et al. (2003) Food Res International 36: 721-727.
Glevin et al. (2003) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67:16-37.
Gong and Jiang (2011) Biotechnol. Lett. 33:1269-1284.
Grant et al. (1995) Plant Cell Rep. 15:254-258.
Greenwell et al. (2011) J. R. Soc. Interface 7:703-726.
Gunstone (2001) Inform 11: 1287-1289.
Hafner et al. (2008) Methods 44:3-12.
Hamdan et al. (2009) Euphytica 168: 61-69.
Henikoff et al. (2004) Plant Physiol 135: 630-636.
Heppard et al. (1996) Plant Physiology 110:311-319.Hernandez et al. (2005) Phytochemistry 66:1417-1426.
Hill and Knowles (1968) Crop Sci. 8:275-277.
Hinchee et al. (1988) Biotechnology 6:915-922.
Hu et al. (1997). N. Engl. J. Med. 337: 1491-1499.
Hugly and Somerville (1992) Plant Physiol. 99:197-202.
Isshiki et al. (2001) Plant Physiol. 125:1388-1395.Jofuku et al. (1989) Plant Cell 1:427-435.
Kang et al. (2011) Plant Physiology and Biochemistry 49:223-229.
Karmakar et al. (2010) Bioresource Technology 101: 7201-7210.
Khadake et al. (2009) Mol Biotechnol. 42: 168-174.
Kim et al. (2006) Molecular Genetics and Genomics 276:351-368.
Knothe (2005) Fuel Process. Technol. 86:1059-1070.
Knothe and Steidley (2005) Fuel 84:1059-1065
Knowles (1968) Economic Botany 22: 195-200.
Knowles (1969) Economic Botany 23:324-329.
Knowles (1972) Journal of the American Oil Chemists' Society 49:27-29.
Knowles (1989) Oil crops of the world : their breeding and utilization / ed G. Robbelen, R. Keith Downey, A.Ashri. McGraw-Hill, New York.
Knowles and Hill (1964) Crop Science 4:406-409.
Lacroix et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A. 105: 15429-15434.
Langridge et al. (2001) Aust J Agric Res 52: 1043-1077.
Lee et al. (1998) Science 280:915-918.
Lemieux (2000) Current Genomics 1: 301-311.

170

Liu (1998) The isolation and characterisation of fatty acid desaturase genes in cotton. PhD. Thesis University of Sydney.
Liu et al. (1999) Functional Plant Biology 26:101-106.
Liu et al. (2001) American Journal of Botany 88:92-102.
Liu et al. (2002a). J. Am. Coll. Nutr. 21: 205S-211S.
Liu et al. (2002b). Plant Physiol. 129: 1732-1743.
Liu et al. (2010) Fuel 89:2735-2740.
Loguercio (1998) Current genetics 34:241-249.
Maher and Bressler (2007) Bioresource Technology 98:2351-2368.
Marangoni et al. (1995) Trends in Food Sci. Techno l. 6: 329-335.
Martinez-Rivas et al. (2001) Molecular Breeding 8: 159-168.
McCartney et al. (2004) Plant J 37: 156-173.
Mensink and Katan (1990). N. Engl. J. Med. 323: 439-445.
Millar and Waterhouse (2005) Funct Integr Genomics 5:129-135.
Mroczka et al. (2010) Plant Physiology 153:882-891.Mundel and Bergman (2009) Safflower. Oil Crops: Handbook of Plant Breeding 4. Ed. J. Vollman and I. Rajcan. Springer Science. Pp 423-447.
Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453.
Niedz et al. (1995) Plant Cell Reports 14:403.
Noakes and Clifton (1998) Am. J. Clin. Nutr. 98: 242-247.
Nykiforuk et al. (2011) Plant Biotechnology Journal 9:250-263.
Oil World Annual (2004) International Seed Testing Association (ISTA) Mielke GmbH, Hamburg, Germany
Okuley et al. (1994) Plant Cell 6:147-158.
Ow et al. (1986) Science 234:856-859.
Pasquinelli et al. (2005) Curr Opin Genet Develop 15: 200-205.
Paterson et al. (1993) Plant Molecular Biology Reporter 11: 122-127.
Perez-Vich et al. (1998) JAOCS 75:547-555
Perrin et al. (2000) Mol Breed 6:345-352.
Peterson et al. (1997) Plant Molecular Biology Reporter 15:148-153.
Petrie et al. (2010) Plant Methods 6: 8-14.
Phillips et al. (2002) Journal of Food Composition and Analysis 12:123-142.
Potenza et al. (2004) In Vitro Cell Dev. Biol. Pla

171

nt 40:1-22.
Prasher et al. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commu n. 127:31-36.
Roche and Gibney (2000) Am. J. Clin. Nutr. 71: 232 S-237S.
Ryan et al. (1984) J. Am. Oil Chem. Soc. 61:1610-1 619.
Sadanandom et al. (1996) Plant Journal 10:235-242.
Scarth and Tang (2006) Crop Science 46:1225-1236.
Scheffler et al. (1997) TAG Theoretical and Applie d Genetics 94:583-591.
Schmittgen (2008) Nature Protocols 3: 1101-1108.
Sebedio et al. (1994) Fett. Wiss. Technol. 96: 235 -239.
Semwal et al. (2011) Bioresource Technology 102:21 51-2161.
Shanklin and Cahoon (1998) Annual Review of Plant Physiology and Plant MolecularBiology 49:611-641.
Slade and Knauf (2005) Transgenic Res 14: 109-115.
Small (2000a) Genetics 155: 1913-1926.
Small (2000b) Molecular phylogenetics and evolutio n 16:73-84.
Smith et al. (2000) Nature 407: 319-320.
Speranza et al. (2012) Process Biochemistry (In Pr ess)
Stalker et al. (1988) Science 242: 419-423.
Stymne and Appelqvist (1978) European Journal of B iochemistry 90:223-229.

172

Tang et al. (2005) The Plant Journal 44:433-446.
Taylor (1997) The Plant Cell 9:1245-1249.
Thelen and Ohlrogge (2002) Metabolic Engineering 4 : 12-21
Thillet et al. (1988) J. Biol. Chem 263:12500-1250 8.
Tholstrup et al. (1994) Am. J. Clin. Nutr. 59: 371 -377.
Toriyama et al. (1986) Theor. Appl. Genet. 205:34.
Tzfira and Citovsky (2006) Curr. Opin. Biotech. 17 :147-154.
Vanrooijen and Moloney (1995) Bio-Technology 13:72 -77.
Voinnet et al. (2003) Plant Journal 33:949-956.
Voinnet et al. (2003) Plant Journal 33: 949-956.
Voelker et al. (1990) Plant Cell 2:255-261.
Waterhouse et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. US A 95: 13959-13964.
Wesley et al. (2001) Plant Journal 27: 581-590.
Wood (2009) Plant Biotechnology Journal 7: 914-924 .Wood et al. (2009) Plant Biotechnology Journal 7: 914-924.
Zhou et al. (2006) Plant Science 170:665-673.
Zhou et al. (2011) Journal of Biological Chemistry 286:2877-2885.
Zock and Katan (1992) J. Lipid Res. 33:399-410.
Zock et al. (1994) Arterioscler Thromb. 14: 567-57 5.

【図１】

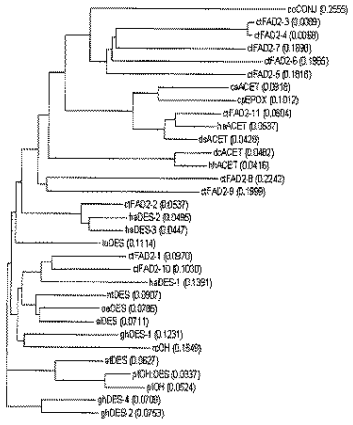

Figure 1

【図２】

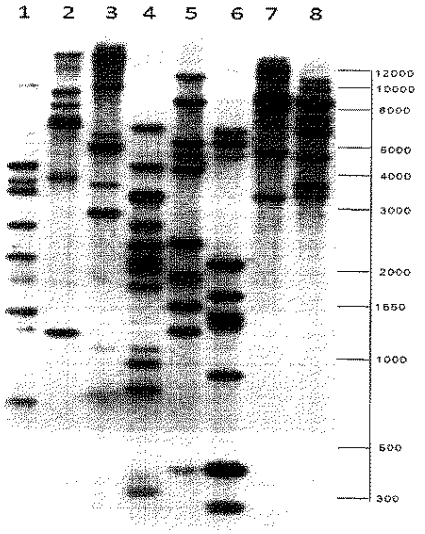

Figure 2

【図３Ａ】

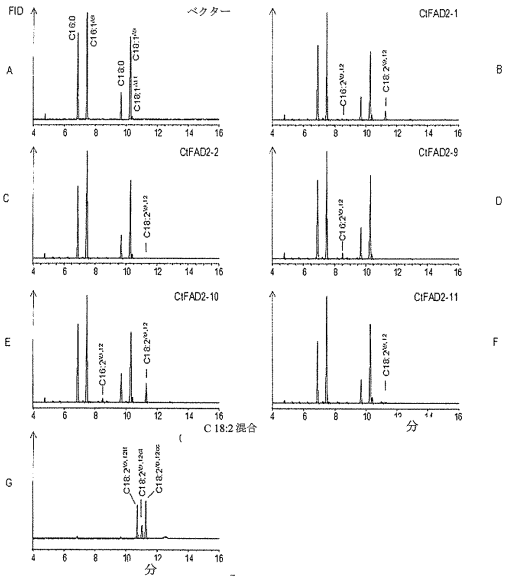

図３

【図３Ｂ】

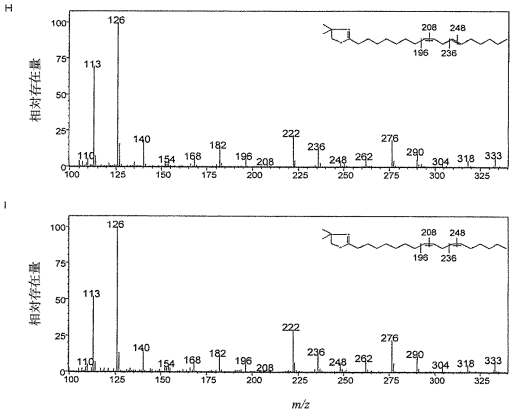

図３

【図４】

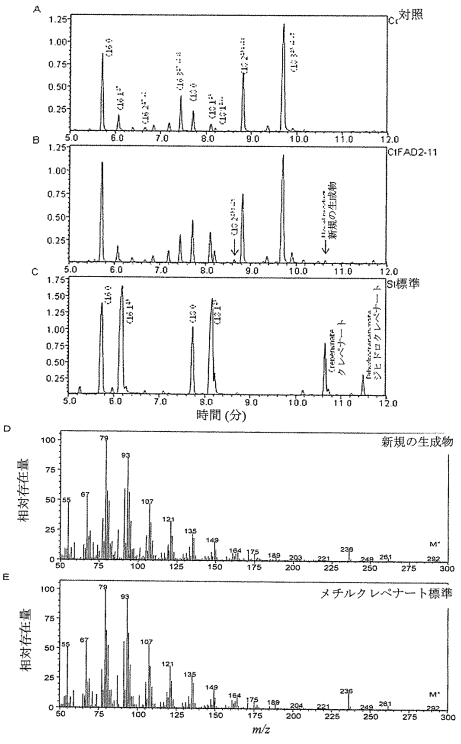

図４

【図５】

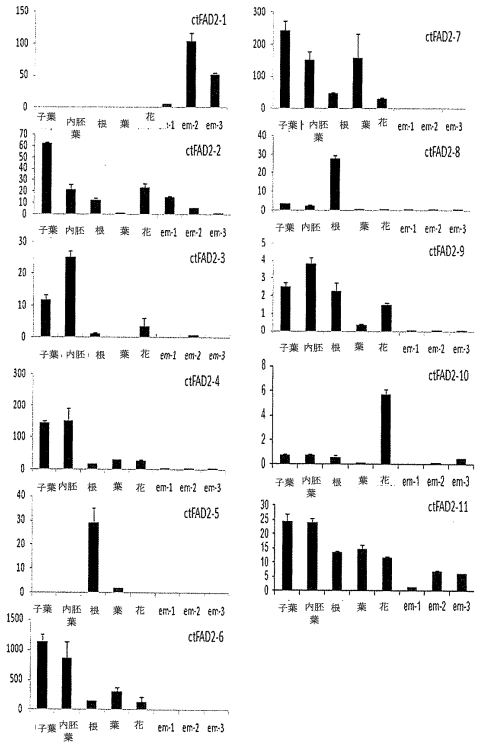

図５

【図６】

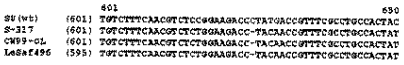

Figure 6

【図７Ａ】

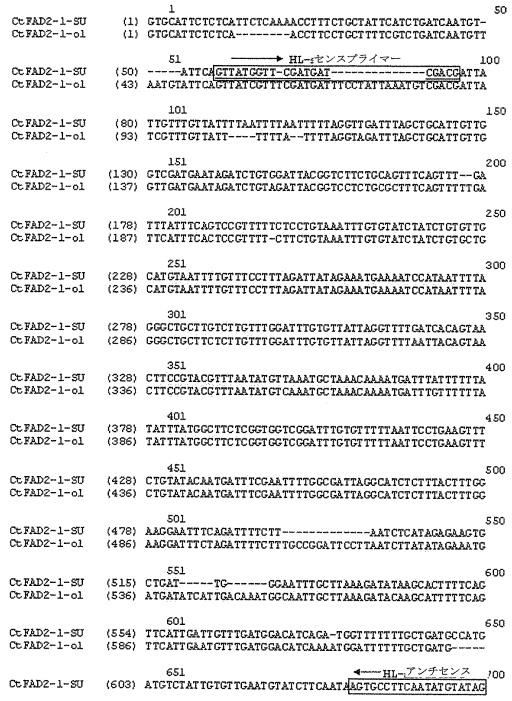

図７

【図７Ｂ】

図７

【図８】

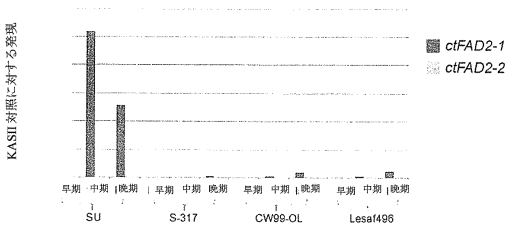

図８

【図９】

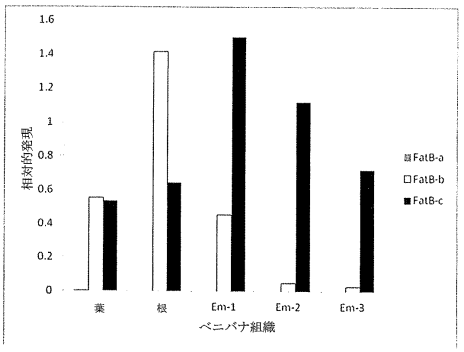

図９

【図１０】

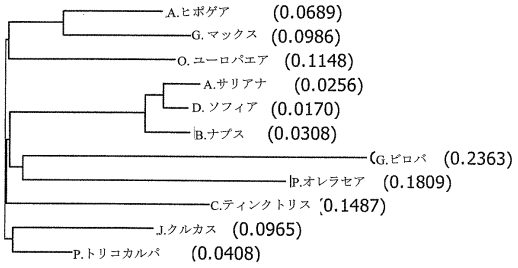

図１０

【図１１】

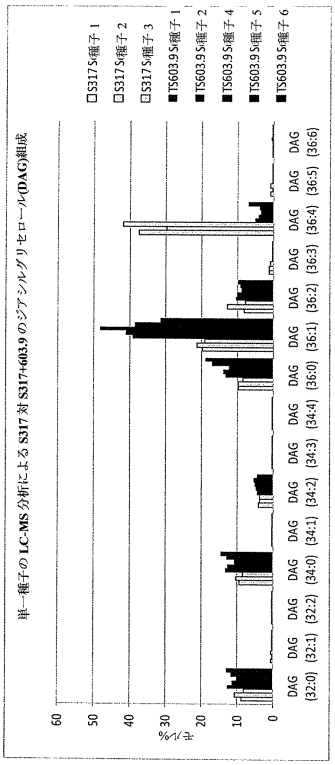

図 11

【図１２】

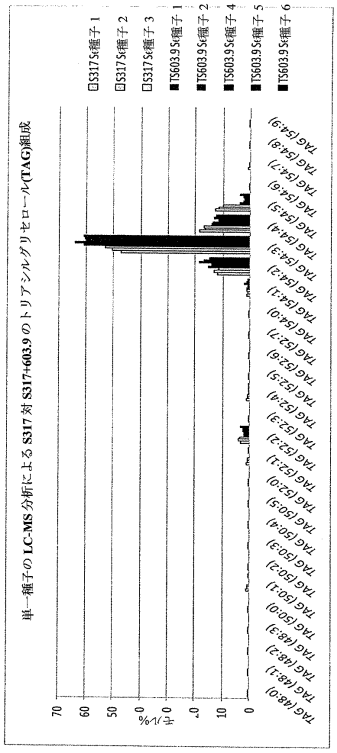

図 12

【図１３】

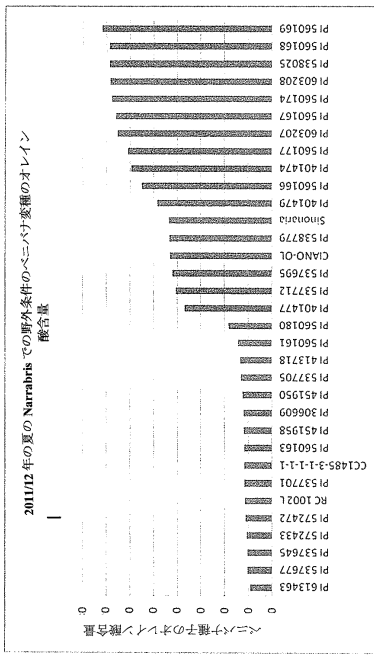

図 13

【図１４】

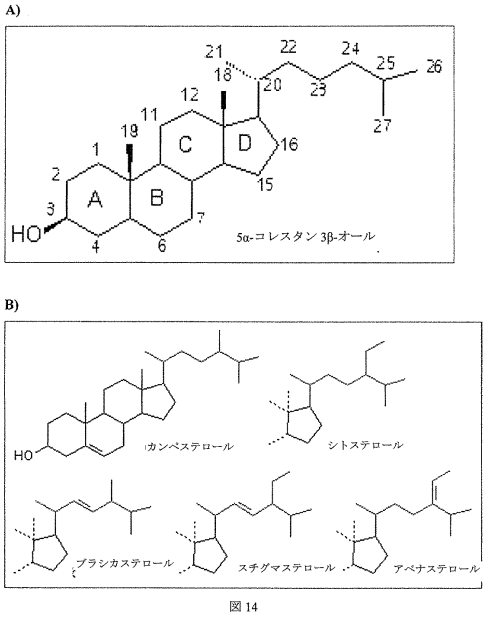

図 14

【配列表】
2015520257000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2013/000426

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01H 5/10 (2006.01) C11B 1/10 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/29 (2006.01) C12N 15/53 (2006.01) A23D 9/00 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, MEDLINE, HCAPLUS, BIOSIS, AGRICOLA & keywords: FAD2, safflower, high oleic, and like terms.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C [X] See patent family annex

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 August 2013	13 August 2013

Name and mailing address of the ISA/AU

AUSTRALIAN PATENT OFFICE
PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA
Email address: pct@ipaustralia.gov.au
Facsimile No.: +61 2 6283 7999

Authorised officer

Richard Filmer
AUSTRALIAN PATENT OFFICE
(ISO 9001 Quality Certified Service)
Telephone No. 0262832735

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International application No. PCT/AU2013/000426
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/0206963 A1 (VOELKER, T. et al.) 14 September 2006 [0003], [0004], [0011]-[0015], [0045]-[0067], [0106], [0165], [0171]-[0203], [0372]-[0374], [0401]-[0406]; Table 11	1-51, 71-74, 84-94
X	CA 2180386 C (CARGILL INCORPORATED, US) 12 September 2006 Abstract; page 4 line 12 – page 6h line 23; page 13 lines 25-32; pages 28-30; Tables 3, 5	1-16, 23-27, 30, 33-43, 47, 50, 51, 71, 73, 74, 84-94
X	WO 2009/086196 A1 (DOW AGROSCIENCES LLC) 09 July 2009 page 6 lines 17-22, pages 29-30; Table 1	1-15, 25, 26, 30, 50, 85-94
X	EP 0496504 A1 (PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC) 09 January 1992 Tables 1, 3, 4, 6	1-15, 25, 26, 30, 50, 85-94
X	US 5912416 A (WEISKER, A. C.) 15 June 1999 Abstract; col. 2 lines 36-64, col 4 lines 23-28; Table 1,	1-15, 25, 26, 30, 50, 85-94
X	BUHR, T. et al., "Ribozyme termination of RNA transcripts down-regulate seed fatty acid genes in transgenic soybean", The Plant Journal, 2002, vol. 30, no. 2, pages 155-163 Abstract; Figure 1c; Table 2; Experimental Procedures	1-16, 18, 21-27, 30, 31, 33-43, 47, 50, 51, 71, 73, 74, 84-94
P,X	WOOD, C., "Deveolpment of super high oleic oil in safflower", presentation at the 20th International Symposium on Plant Lipids, Published July 2012, [retrieved from Internet 19 July 2013] <URL: http://www.ispl2012.org/oralpdfs/S11%20O6%20Craig%20Wood%20SHO%20safflower.pdf> See whole document	1-51, 71-74, 84-94

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2013/000426

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☐ in electronic form

   b. (time)

   ☐ in the international application as filed

   ☐ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:
   An electronic sequences listing was filed together with the international application in electronic form, but was not used for the purposes of the search and opinion.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2013/000426

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental Box for Details

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-51 (completely) and claims 71-74 and 84-94 (in part)
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/AU2013/000426

Supplemental Box

Continuation of: **Box III**
This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

This Authority has found that there are different inventions based on the following features that separate the claims into distinct groups:

•Invention 1 is defined by claims 1-16 and 25-27 (completely) and claims 18-24, 30-51, 71-74 and 84-94 (in part). The feature of a lipid extracted from an oilseed comprising at least 95% by weight triacylglycerols, about 90% to about 95% by weight of the total fatty acid content being oleic acid, less than about 3.1% by weight of the total fatty acid content being palmitic acid, and the oleic desaturation proportion being less than about 0.037 and/or the palmitic-linoleic-oleic value being less than about 0.063, is specific to this group of claims.

•Invention 2 is defined by claims 17, 28 and 29 (completely) and claims 18-24, 30-51, 71-74 and 84-94 (in part). The feature of a process for producing oil comprising obtaining a safflower seed whose oil content comprises at least 95% by weight triacylglycerols, about 75% to about 95% by weight of the total fatty acid content being oleic acid, less than about 5.1% by weight of the total fatty acid content being palmitic acid, and the oleic desaturation proportion being less than about 0.17 and/or the palmitic-linoleic-oleic value being less than about 0.26, wherein the safflower seed comprises a transgenic silencing RNA that reduces expression of Δ12 desaturase (FAD2), is specific to this group of claims.

•Invention 3 is defined by claims 76-83 (completely) and claims 52-75 and 84-94 (in part). The feature of a FAD2 gene or polypeptide is specific to this group of claims.

•Invention 4 is defined by claims 52-75 and 84-94 (in part). The feature of a FATB gene or polypeptide is specific to this group of claims.

•Invention 5 is defined by claims 52-75 and 84-94 (in part). The feature of a FAD6 gene or polypeptide is specific to this group of claims.

PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art.

When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention.

In the above groups of claims, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. The only feature common to various sets of inventions as defined above and which provides a technical relationship among them is a lipid of high oleic acid content or a fatty acid modifying enzyme (such as FAD2). However these features do not make a contribution over the prior art because they are disclosed in:

US2006/0206963 A1 (VOELKER et al.) 14 September 2006

Therefore in the light of this document these common features cannot be special technical features. Therefore there is no special technical feature common to all the claimed inventions and the requirements for unity of invention are consequently not satisfied *a posteriori*.

The applicant has paid one additional fee, and as such Inventions 1 and 2 are subject to a search and examination.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members	International application No. **PCT/AU2013/000426**

This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
US 2006/0206963 A1	14 Sep 2006	AR 039716 A1	09 Mar 2005
		AR 059450 A1	09 Apr 2008
		AR 059811 A1	30 Apr 2008
		AU 2003214247 A1	08 Oct 2003
		AU 2003214247 B2	09 Sep 2010
		AU 2003277812 A1	06 Jan 2004
		AU 2004276819 A1	07 Apr 2005
		AU 2004276819 A2	07 Apr 2005
		AU 2004276819 B2	12 Mar 2009
		AU 2007215181 A1	23 Aug 2007
		AU 2007215181 A2	30 Oct 2008
		AU 2007215181 B2	23 Aug 2012
		AU 2007226680 A1	20 Sep 2007
		BR 0308614 A	09 Feb 2005
		BR 0312162 A	29 May 2007
		BR PI0414743 A	21 Nov 2006
		BR PI0707755 A2	26 Apr 2011
		BR PI0708748 A2	28 Jun 2011
		CA 2479587 A1	02 Oct 2003
		CA 2490771 A1	31 Dec 2003
		CA 2540049 A1	07 Apr 2005
		CA 2641264 A1	23 Aug 2007
		CA 2645148 A1	20 Sep 2007
		CN 1655669 A	17 Aug 2005
		CN 1735690 A	15 Feb 2006
		CN 1886042 A	27 Dec 2006
		CN 101421406 A	29 Apr 2009
		CN 101500403 A	05 Aug 2009
		CN 101565716 A	28 Oct 2009
		EP 1484959 A2	15 Dec 2004
		EP 1516056 A2	23 Mar 2005
		EP 1670307 A2	21 Jun 2006
		EP 1984508 A2	29 Oct 2008
		EP 1993349 A2	26 Nov 2008
		EP 2294915 A2	16 Mar 2011
		EP 2336334 A1	22 Jun 2011

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members	International application No. PCT/AU2013/000426

This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
		EP 2562260 A1	27 Feb 2013
		JP 2005530506 A	13 Oct 2005
		JP 2007506437 A	22 Mar 2007
		JP 2009526550 A	23 Jul 2009
		KR 20050027222 A	18 Mar 2005
		KR 20060063997 A	12 Jun 2006
		KR 20080009243 A	25 Jan 2008
		KR 20080107415 A	10 Dec 2008
		MX PA04009134 A	25 Jan 2005
		MX PA05000195 A	08 Apr 2005
		MX 2008010413 A	09 Jan 2009
		MX 2008011625 A	14 Nov 2008
		RU 2008136856 A	20 Mar 2010
		US 2004126845 A1	01 Jul 2004
		US 7166771 B2	23 Jan 2007
		US 2006206963 A1	14 Sep 2006
		US 7566813 B2	28 Jul 2009
		US 2004006792 A1	08 Jan 2004
		US 7601888 B2	13 Oct 2009
		US 2007214516 A1	13 Sep 2007
		US 7790953 B2	07 Sep 2010
		US 2007074305 A1	29 Mar 2007
		US 7795504 B2	14 Sep 2010
		US 2010218269 A1	26 Aug 2010
		US 7943818 B2	17 May 2011
		US 2004107460 A1	03 Jun 2004
		US 2005262588 A1	24 Nov 2005
		US 2006080750 A1	13 Apr 2006
		US 2007192903 A1	16 Aug 2007
		US 2008222756 A1	11 Sep 2008
		US 2009119805 A1	07 May 2009
		US 2009151029 A1	11 Jun 2009
		US 2010240128 A1	23 Sep 2010
		US 2011239335 A1	29 Sep 2011
		US 2013067621 A1	14 Mar 2013
		UY 30147 A1	28 Sep 2007

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members	International application No. **PCT/AU2013/000426**

This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
		WO 03080802 A2	02 Oct 2003
		WO 2004000871 A2	31 Dec 2003
		WO 2005030982 A2	07 Apr 2005
		WO 2007095243 A2	23 Aug 2007
		WO 2007106728 A2	20 Sep 2007
		ZA 200407546 A	30 Sep 2005
		ZA 200410152 A	22 Feb 2006

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members	International application No. PCT/AU2013/000426

This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
CA 2180386 C	12 Sep 2006	CA 2547678 A1	04 Jan 1998
WO 2009/086196 A1	09 Jul 2009	AU 2008345666 A1	09 Jul 2009
		CA 2712284 A1	09 Jul 2009
		CN 101945573 A	12 Jan 2011
		EP 2234475 A1	06 Oct 2010
		EP 2586293 A1	01 May 2013
		RU 2010130256 A	27 Jan 2012
		US 2009169706 A1	02 Jul 2009
		US 2009181149 A1	16 Jul 2009
		US 2011131689 A1	02 Jun 2011
		US 2011145952 A1	16 Jun 2011
		US 2013071799 A1	21 Mar 2013
		US 2013072705 A1	21 Mar 2013
		US 2013096331 A1	18 Apr 2013
		WO 2009086196 A1	09 Jul 2009
EP 0496504 A1	09 Jan 1992	AU 1013292 A	16 Jul 1992
		AU 3065895 A	30 Nov 1995
		BR 9205060 A	22 Jun 1993
		CA 2058849 A1	10 Jul 1992
		CA 2129621 A1	10 Jul 1992
		EP 0496504 A1	29 Jul 1992
		HU T66874 A	30 Jan 1995
		JP H05199821 A	10 Aug 1993
		NZ 241263 A	26 Oct 1994
		US 5276264 A	04 Jan 1994
		US 5461171 A	24 Oct 1995
US 5912416 A	15 Jun 1999	None	

End of Annex

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/10*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/00	１０３	４Ｈ０５９
Ｃ１２Ｑ	*1/68*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/68	Ａ	
Ｃ１２Ｎ	*9/00*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/00		
Ｃ１２Ｎ	*15/113*	*(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ｇ	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(74)代理人 100064908
弁理士 志賀 正武
(74)代理人 100089037
弁理士 渡邊 隆
(74)代理人 100110364
弁理士 実広 信哉
(72)発明者 クレイグ・クリストファー・ウッド
オーストラリア・２６０２・オーストラリアン・キャピタル・テリトリー・ディクソン・ドゥマレスク・ストリート・３３
(72)発明者 キン・リウ
オーストラリア・２６１７・オーストラリアン・キャピタル・テリトリー・ジララン・ミラブッカ・クレセント・２２
(72)発明者 シェ－ロン・ツォウ
オーストラリア・２６１７・オーストラリアン・キャピタル・テリトリー・エヴァット・ヘイドン・クレセント・５３
(72)発明者 アラン・グリーン
オーストラリア・２６０３・オーストラリアン・キャピタル・テリトリー・レッド・ヒル・インヴェスティゲーター・ストリート・７
(72)発明者 スリンダー・パル・シン
オーストラリア・２６０２・オーストラリアン・キャピタル・テリトリー・ダウナー・ルーカス・プレイス・１０
(72)発明者 シジャン・カオ
オーストラリア・２６１５・オーストラリアン・キャピタル・テリトリー・フローリー・デンディ・プレイス・４

Ｆターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD08 CA11 CA17 CB02
4B024 AA05 BA07 BA11 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 DA01 EA04
EA10 FA02 GA11 HA01 HA08 HA09
4B050 CC03 DD13 EE10 LL02
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ04 QQ09 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55
QR62 QS25 QS32 QX01
4B065 AA87X AA87Y AA88X AA88Y AA89X AA89Y AB01 AC14 BA01 CA13
CA41
4H059 BA33 BB02 BB03 BB04 BC13